

Aus dem Bereich Physiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

---

# **Die Rolle von Signaltransduktionselementen bei der Wahrnehmung olfaktorischer Signale im Vomeronasalorgan der Maus:**

## **Die Funktion des G-Proteins $G\alpha_o$ und von MHC-Molekülen der Klasse Ib**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2014

**PHILIPP HENDRIX**

**GEBOREN AM 29.02.1988 IN BOCHOLT**

meiner Familie gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Das Geruchsorgan</b>	<b>6</b>
<b>2.2 Das hauptolfaktorische System</b>	<b>8</b>
2.2.1 Funktion und Anatomie	8
2.2.2 Chemorezeptoren	9
2.2.3 Signaltransduktion	10
<b>2.3 Das akzessorische olfaktorische System</b>	<b>12</b>
2.3.1 Funktion und Anatomie	12
2.3.2 Chemorezeptoren	14
2.3.3 V1R	14
2.3.4 V2R	15
2.3.5 FPR	17
2.3.6 Signaltransduktion	18
2.3.7 Mögliche Funktionen von H2Mv	22
<b>2.4 Weitere olfaktorische Subsysteme</b>	<b>26</b>
<b>2.5 Verschaltung olfaktorischer Stimuli in höhere Zentren</b>	<b>27</b>
<b>2.6 Pheromone</b>	<b>28</b>
2.6.1 Einleitung	28
2.6.2 Volatile Urinduftstoffe (VUDs)	29
2.6.3 Major Urinary Proteins (MUPs)	31
2.6.4 Major Histocompatibility Complex Peptide (MHC-Peptide)	33
2.6.5 Exocrine gland secreting Peptid (ESP)	35
2.6.6 Formylierte Peptide und hFPR-aktivierende Peptide	36
2.6.7 Steroidderivate	38
<b>2.7 Pheromon-induzierte Effekte</b>	<b>39</b>
2.7.1 Östrus-Modulation und Modulation der reproduktiven Phase	39
2.7.2 Aggressionsverhalten	39
2.7.3 Sexualverhalten	40
2.7.4 Erkennen von Individualität	42

2.8	Fragestellungen und Ziele der Arbeit	45
3	<b>Material und Methoden</b>	47
3.1	Einleitung	47
3.2	Historie des Elektrovomeronasogramms	47
3.3	Mauslinien	49
3.3.1	Die konditionelle $G\alpha_o$ -Knockoutmauslinie $cG\alpha_o^{-/-}$	49
3.3.2	C57BL/6 und $Gnao1^{fx/fx}$ als Kontrollmäuse der $cG\alpha_o^{-/-}$	51
3.3.3	Die H2Mv-Knockoutmauslinie $\Delta H2Mv$	51
3.3.4	129/Sv: die Kontrollmauslinie der $\Delta H2Mv$	52
3.4	Lösungen	53
3.4.1	Die extrazelluläre S1-Lösung	53
3.4.2	Die extrazelluläre S2-Lösung	54
3.5	Stimuli und Pharmaka	55
3.5.1	Produktion des rekombinanten ESP1	55
3.5.2	Produktion des rekombinanten MUP25	55
3.5.3	Produktion der formylierten Peptide und der MHC-Peptide	56
3.5.4	Produktion der volatilen Stimuli	56
3.6	Stimulationspipette	57
3.7	Elektroden	59
3.7.1	Ableitelektrode	59
3.7.2	Referenzelektrode	61
3.8	Messplatz	62
3.9	Experiment	64
3.9.1	Präparation	64
3.9.2	Versuchsablauf	66
3.10	Fehlereinschätzung	68
3.11	Aussagekraft des EVG	69
3.12	Dosis-Wirkungs-Kurven	70
3.13	Statistik und Mathematik	71
3.14	Verwendete Stimuli mit Konzentrationen	72
4	<b>Ergebnisse</b>	74
4.1	Einleitung	74

<b>4.2</b>	<b>Bekannte Liganden der vomeronasalen Sinneszellen evozieren robuste Feldpotentiale im VNO der Maus</b>	<b>76</b>
<b>4.3</b>	<b>Experimente in der konditionellen <math>G\alpha_o</math>-Knockoutmauslinie</b>	<b>78</b>
4.3.1	Das G-Protein $G\alpha_o$ ist essentiell für die elektrische Aktivierbarkeit von vomeronasalen V2R-Sinneszellen	78
4.3.2	Agonisten der humanen Formyl-Peptid-Rezeptoren aktivieren auch vomeronasale Sinneszellen	82
4.3.3	Einige Agonisten der humanen Formyl-Peptid-Rezeptoren aktivieren ausschließlich $G\alpha_o$ -exprimierende vomeronasale Sinneszellen	83
4.3.4	Der volatile Duftstoff Isoamylamin wird von vomeronasalen Sinneszellen detektiert und $G\alpha_o$ -unabhängig transduziert	87
<b>4.4</b>	<b>Experimente in der H2Mv-Knockoutmauslinie</b>	<b>89</b>
4.4.1	Einleitung	89
4.4.2	H2Mv fungiert nicht als Rezeptor für V2R-Liganden	90
4.4.3	H2Mv trägt zur ultrasensitiven Chemodetektion von V2R-VSNs bei	92
4.4.4	Einige hFPR-aktivierende Peptide sind V2R-Liganden und H2Mv trägt zur ultrasensitiven Chemodetektion dieser Peptide bei	97
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>102</b>
<b>5.1</b>	<b>G-Proteine in der Signaltransduktion von vomeronasalen Sinneszellen</b>	<b>102</b>
5.1.1	Die Funktion von $G\alpha_o$ in vomeronasalen Sinneszellen	102
5.1.2	Die konditionelle Knockoutmauslinie $cG\alpha_o^{-/-}$	105
5.1.3	Elektrovomeronasogramme in $cG\alpha_o^{-/-}$	106
5.1.4	Kalziumimaging, Verhaltensexperimente und das hauptfaktorisches System von $cG\alpha_o^{-/-}$	106
5.1.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	109
<b>5.2</b>	<b>Die Funktion von H2Mv in vomeronasalen V2R-Sinneszellen</b>	<b>112</b>
5.2.1	Die H2Mv-Knockoutmauslinie erlaubt die Untersuchung der in vivo Funktion von H2Mv	112
5.2.2	Die Anatomie des AOS der $\Delta H2Mv$	114
5.2.3	Elektrovomeronasogramme in $\Delta H2Mv$	115
5.2.4	Kalziumimaging in $\Delta H2Mv$	116
5.2.5	Der zelluläre Phänotyp der $\Delta H2Mv$	117
5.2.6	Verhaltensexperimente in $\Delta H2Mv$	118
5.2.7	Vergleich von $G\alpha_o$ und H2Mv-Knockoutmauslinie	119
5.2.8	Schlussfolgerungen aus den Experimenten in $\Delta H2Mv$	120
5.2.9	Ausblick	120
<b>5.3</b>	<b>Formyl-Peptid-Rezeptoren und die Erkennung formylierter Peptide im Vomeronaslorgan der Maus</b>	<b>123</b>

5.3.1	Eine immunologische Funktion? _____	123
5.3.2	Verschiedene vomeronasale Sinneszellen erkennen prototypische humane FPR-Agonisten _____	124
5.3.3	Die Erkennung Krankheits-assoziiierter Zustände über das Vomeronasalorgan? ____	127
<b>6</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> _____	<b>130</b>
	<b><i>Publikationen</i></b>	<b>143</b>
	<b><i>Danksagungen</i></b>	<b>144</b>
	<b><i>Lebenslauf</i></b>	<b>145</b>

## Abkürzungsverzeichnis

129/Sv	Kontrollmauslinie der $\Delta H2Mv$
AA	Arachidonsäure
AC	Adenylatzyklase
AMP	Adenosin-Monophosphat
ADP	Adenosin-Diphosphat
ANO2	Anoctamin 2, ein Kalzium-aktivierter-Chlorid-Kanal
ANOVA	Analysis of variances; Varianzanalyse
AOB	Akzessorischer olfaktorischer Bulbus
AOS	Akzessorisches olfaktorisches System
AP	Aktionspotential
b2m	beta-2-Mikroglobulin
B6	C57BL/6, im Labor gehaltene Wildtypmauslinie
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CaCC	Kalzium-abhängiger-Chlorid-Kanal
cG $\alpha_o^{-/-}$	konditioneller G $\alpha_o$ -Knockout
CGL	Corpus geniculatum laterale
Cre	Cyclization recombination - Enzym (Cre/loxP-System)
CNG	Cyclic-nucleotid-gated, durch zyklische Nukleotide gesteuert
COI	Cytochrom-C-Oxidase I
DAG	Diacylglycerol
DHB	2,3-Dehydrobrevicomin
DMP	2,5-Dimethylpyrazin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
ESP	Exocrine gland secreting peptide
EVG	Elektrovomeronasogramm
f-MLF	formyliertes Tripeptid mit der Aminosäuresequenz MLF
FPR	Formyl-Peptid-Rezeptor
G $\alpha_o^{fx/fx}$	Mauslinie mit von loxP flankierten Abschnitten im Gnao1-Gen
GCD	Guanylyl cyclase-D
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GG	Grüneberg-Ganglion
GIRK	G-Protein-aktivierter Kalium-Kanal

Gnao1	Genabschnitt, welcher für das G-Protein G $\alpha_o$ kodiert
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon, Gonadoliberin
H2Mv	Chromosomen Locus M des H2-Abschnittes
hFPR	humaner Formyl-Peptid-Rezeptor
HMW	High molecular weight Fraktion
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
kDA	Kilodalton
KO	Knockout
LMW	Low molecular weight Fraktion
LoxP	Markierungssequenz im Cre/loxP System
LSD	least significant difference (Fisher's)
M	Mittelwert als Abkürzung; Mol als SI-Einheit
MBP	Maltose-binding-protein
MHC	Major histocompatibility complex
mFPR	muriner Formyl-Peptid-Rezeptor
mFpr-rs	muriner Formyl-Peptid-Rezeptor (auch im Vomeronasalorgan)
MM	Mikromanipulator
MOB	Main olfactory bulb, hauptolfaktorischer Bulbus
MOE	Main olfactory epithelium, hauptolfaktorisches Epithel
MOS	Main olfactory system, hauptolfaktorisches System
MUP	Major urinary protein
N	Anzahl
ND1	NADH-Dehydrogenase 1 des Mitochondriums
ND1-6I	NADH-Dehydrogenase Untereinheit, die für f-MFFINLTL kodiert
ND1-6T	NADH-Dehydrogenase Untereinheit, die für f-MFFINTLTL kodiert
OMP	Olfaktorisches Marker Protein
OR	Olfaktorischer Rezeptor
Osm	Osmolarität
OSN	Olfaktorisch sensorisches Neuron
PDE4A	Phosphodiesterase 4A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussis-Toxin
PUFA	Polyunsaturated fatty acids – mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RIA	Resident-Intruder-Assay
SBT	2-sec-Butyl-4,5-Dihydrothiazol
SEM	Standard error of mean = Standardfehler



SF	Standardfehler
SK3	ein Kalizum-aktivierter-Kalium-Kanal
SOM	Septal organ of Masera
TAAR	Trace amino acid receptor – ein Aminosäure Rezeptor
TRP-Kanal	Transient receptor potential Kanal (Ionenkanal)
TRPC2	canonical Transient receptor potential Ionenkanal 2
VNO	Vomeronasalorgan
V1r	V1-Rezeptorgen
V1R	V1-Rezeptor
V2r	V2-Rezeptorgen
V2R	V2-Rezeptor
VSN	Vomeronasale Sinneszelle
VUD	Volatiler Urinduftstoff

## Aminosäuren mit Buchstabencode und Abkürzung

Alanin A Ala	Arginin R Arg	Asparagin N Asn
Aspartat D Asp	Cystein C Cys	Glutamat E Glu
Glutamin Q Gln	Glycin G Gly	Histidin H His
Isoleucin I Ile	Leucin L Leu	Lysin K Lys
Methionin M Met	Phenylalanin F Phe	Prolin P Pro
Serin S Ser	Threonin T Thr	Tryptophan W Trp
Tyrosin Y Tyr	Valin V Val	

# Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DAS OLFAKTORISCHE SYSTEM	7
ABBILDUNG 2: DAS HAUPTOLFAKTORISCHE SYSTEM	9
ABBILDUNG 3: KORONARSCHNITT DURCH DAS SEPTUM DER NASE	13
ABBILDUNG 4: SIGNALTRANSDUKTIONSMODELL DER V1- UND V2-REZEPTORNEURONE	21
ABBILDUNG 5: ÜBERSICHT ÜBER EINIGE PHEROMON-EFFEKTE	29
ABBILDUNG 6: DER BRUCE-EFFEKT	35
ABBILDUNG 7: VERPAARUNG DER MAUSLINIEN ZUR HERSTELLUNG DER $CGA_0^{-/-}$	50
ABBILDUNG 8: DIE MULTI-STIMULATIONSPIPETTE	58
ABBILDUNG 9: DIE ABLEITELEKTRODE UND DIE REFERENZELEKTRODE	60
ABBILDUNG 10: NAHANSICHT MESSPLATZ	63
ABBILDUNG 11: GESAMTÜBERSICHT MESSTISCH MIT MIKROSKOP	64
ABBILDUNG 12: ANFERTIGUNG DES MESSPRÄPARATES	65
ABBILDUNG 13: EVGS IN B6-WILDTYPE	76
ABBILDUNG 14: EVGS IN B6-WILDTYPE UND $GA_0$ -KNOCKOUT	79
ABBILDUNG 15: V1R- UND V2R-LIGANDEN IN B6, $GA_0^{FX/FX}$ & $CGA_0^{-/-}$	80
ABBILDUNG 16: EVGS IN B6-WILDTYPE MIT HFPR-PEPTIDEN	82
ABBILDUNG 17: EVGS IN B6-WILDTYPE UND $GA_0$ -KNOCKOUT MIT HFPR-PEPTIDEN	84
ABBILDUNG 18: HFPR-AKTIVIERENDE PEPTIDE GEMESSEN IN B6, $GA_0^{FX/FX}$ & $CGA_0^{-/-}$	85
ABBILDUNG 19: ISOBUTYLAMIN UND ISOAMYLAMIN IN B6, $GA_0^{FX/FX}$ & $CGA_0^{-/-}$	88
ABBILDUNG 20: V1R- UND V2R-LIGANDEN IN 129/SV UND $\Delta H2MV$	91
ABBILDUNG 21: RMUP25 IN 129/SV UND $\Delta H2MV$	93
ABBILDUNG 22: DOSIS-WIRKUNGSKURVEN SEIDLILGY, ESP1 UND RMUP25	94
ABBILDUNG 23: HFPR- PEPTIDE IN 129/SV UND $\Delta H2MV$	98
ABBILDUNG 24: DOSIS-WIRKUNGSKURVE F-MFFINTLTL	100



# 1 Zusammenfassung

Bei Säugetieren ist die Pheromonkommunikation entscheidend an der Kontrolle von angeborenem Sozialverhalten beteiligt. Erkannt werden Pheromone vom olfaktorischen System, welches aus mehreren sensorischen Subsystemen besteht. Das akzessorische olfaktorische System mit dem Vomeronasalorgan als peripheren Pheromonsensor stellt eines dieser Subsysteme dar. Es hat aufgrund seiner essentiellen Funktion in der chemischen Kommunikation eine herausragende Bedeutung gewonnen. Das Vomeronasalorgan besitzt vomeronasale Sinneszellen, die anatomisch und molekulargenetisch in eine apikale V1-Rezeptor/ $G\alpha_{i2}$ -exprimierende und in eine basale V2-Rezeptor/ $G\alpha_o$ -exprimierende Sinneszellschicht unterteilt werden können. Ein Teil der V2-Rezeptor/ $G\alpha_o$ -exprimierenden Sinneszellen koexprimieren H2Mv, ein nicht klassisches MHC-Molekül der Klasse Ib. Die Funktion der einzelnen Sinneszellschichten mit ihrer unterschiedlichen anatomischen Lage, Rezeptorausstattung, G-Protein-Expression und axonalen Projektion ist bisher unbekannt.

Die Dekonstruktion der physiologischen Pheromonwahrnehmung ermöglicht die Entschlüsselung, wie chemische Kommunikationsmoleküle prozessiert werden und wie diese Moleküle anschließend über neuronale Schaltkreise angeborene Verhaltensmuster auslösen können. Die genetische Deletion definierter Signaltransduktionselemente erlaubt die Charakterisierung der Funktion dieser Elemente in der Pheromonkommunikation.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der Signaltransduktionsmoleküle  $G\alpha_o$  und H2Mv der V2-Rezeptor-Sinneszellen im Rahmen der chemischen Kommunikation zu bestimmen. Dazu wurden die gewebsspezifische  $G\alpha_o$ -Knockoutmauslinie und die H2Mv-Knockoutmauslinie mit ihren jeweils korrespondierenden Kontrollmauslinien detailliert elektrophysiologisch untersucht. Neben der Bestimmung der Funktion von  $G\alpha_o$  und H2Mv konnten bisher nicht bekannte Stoffe als Liganden für vomeronasale Sinneszellen in Wildtypmäusen identifiziert werden. Die Verwendung dieser neu-identifizierten Liganden in den Knockoutmauslinien

ermöglichte die Eingrenzung der neuen Liganden auf die transduzierenden Sinneszellsubpopulationen.

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung der vomeronasalen Sinneszellen wurde das vomeronasale Sinnesepithel mit verschiedenen Agonisten stimuliert. Von der Oberfläche des aktivierten Sinnesepithels wurden dann die induzierten Potentialänderungen – die sogenannten Elektrovomeronasogramme – abgeleitet.

Es zeigte sich, dass V2-Rezeptor-Agonisten in der  $G\alpha_o$ -Knockoutmauslinie nahezu keine Potentialänderungen mehr evozieren konnten, woraus geschlossen wurde, dass das G-Protein  $G\alpha_o$  essentiell für die Signaltransduktion in V2-Rezeptor-Sinneszellen ist. Die Stimulation H2Mv-defizienter V2-Rezeptor-Sinneszellen erforderte die Applikation erhöhter Konzentrationen der V2-Rezeptor-Agonisten, um physiologische Potentialänderungen zu evozieren. Daraus konnte abgeleitet werden, dass H2Mv in den H2Mv-exprimierenden V2-Rezeptor-Sinneszellpopulation essentiell für deren ultrasensitive Chemodetektion ist. Ein volatiles Amin und bisher nicht getestete formylierte und synthetische Peptide konnten robuste Potentialänderungen im Wildtyp-Vomeronasalorgan evozieren, sodass diese Peptide als neu-identifizierte Liganden des Vomeronasalorgans beschrieben werden konnten. Einige dieser neu-identifizierten Agonisten werden  $G\alpha_o$ - und H2Mv-abhängig transduziert.

In Zusammenschau mit weiteren physiologischen Untersuchungen und Verhaltensexperimenten ermöglichen die hier dargestellten Ergebnisse die Entschlüsselung der Funktion von  $G\alpha_o$  und H2Mv in der Pheromonkommunikation. Darüber hinaus tragen die Resultate entscheidend dazu bei, die neuronalen Schaltkreise der Pheromonkommunikation in Säugetieren weiter aufzudecken.

# Summary

## **Role of signal transduction elements in the detection of olfactory signals in the mouse vomeronasal organ:**

### **Impact of the G-protein $G\alpha_o$ and MHC class Ib molecules**

In mammals, pheromone communication is critically involved in the control of instinctive social behaviours. Pheromones are detected by the olfactory system that is subdivided in several subsystems. One of these subsystems, the accessory olfactory system and its chemoreceptor unit the vomeronasal organ, has attracted particular attention due to its pivotal function in chemical communication. The vomeronasal organ contains vomeronasal sensory neurons that can be anatomically and molecularly subdivided. Apical sensory neurons express V1-receptors and the G-protein  $G\alpha_{i2}$ , and basal sensory neurons express V2-receptors and  $G\alpha_o$ . Moreover, a subset of the basal V2-receptor/ $G\alpha_o$ -expressing sensory neurons co-expresses H2Mv, a family of non-classical MHC Ib molecules. Therefore, the layers of the vomeronasal sensory epithelium differ in anatomy, receptor-expression, G-protein expression and axonal projections. The functional role of such segregation remains unclear.

To understand how pheromones are processed and subsequently elicit innate social behaviours, various approaches can be used. One of the most efficient strategies is genetic deletion of defined signal transduction elements to determine their function in pheromone communication. Particularly, the aim of this work was to elucidate the function that  $G\alpha_o$  and H2Mv play in V2-receptor-expressing sensory neurons during pheromone detection.

To address these questions, a detailed electrophysiological analysis of two mutant mouse models: a conditional, tissue specific  $G\alpha_o$ -knockout mouse, and a H2Mv-knockout, and their

corresponding controls was performed. In addition to the examination of  $G\alpha_o$  and H2Mv mutant mouse lines, a volatile amine and various formylated and synthetic peptides have successfully been identified as agonists for vomeronasal sensory neurons. Application of these new agonists to knockout vomeronasal organ preparations allowed to establish which of these ligands are transduced by specific sensory neuron subpopulations.

To determine the electrophysiological sensory properties of the vomeronasal organ, vomeronasal sensory neurons were stimulated with potential agonists and ligand-evoked local field potentials (electrovomerinosograms) were recorded from the surface of the sensory epithelium.

Responses of vomeronasal sensory neurons from  $G\alpha_o$ -deficient mice to ligands known to activate V2-receptors were virtually absent. Thus, it is concluded that  $G\alpha_o$  is essential for signaling in V2-receptor sensory neurons. Stimulation of vomeronasal sensory neurons from H2Mv-deficient mice required the application of higher concentrations of V2-receptor ligands to evoke comparative robust, physiological field potentials, as seen in control mice preparations. Therefore, H2Mv is essential for ultrasensitive chemodetection in a subset of V2-receptor sensory neurons. Robust field potentials could be elicited by a volatile amine, and formylated and synthetic peptides in control vomeronasal organs, identifying these stimuli as novel ligands for vomeronasal sensory neurons. Some of these new agonists required both  $G\alpha_o$  and H2Mv for signaling.

These results together with further physiological and behavioural analysis of the mutants helped to unravel the function of  $G\alpha_o$  and H2Mv in mammalian pheromone communication and will provide significant insights to identify neuronal circuits that control instinctive behaviours.





## 2 Einleitung

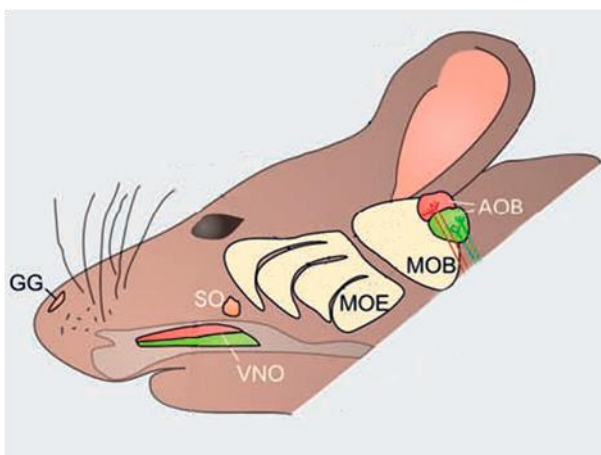
### 2.1 Das Geruchsorgan

Riechen ist die Wahrnehmung von chemischen Signalen aus der Umwelt über die Nase und gehört zu den fünf Hauptsinnen. Für viele ist das Riechen lediglich ein Sinn, der der Erkennung von Gerüchen dient, dabei sind die Funktionen des olfaktorischen System mannigfaltig und unterliegende Mechanismen noch weitestgehend unbekannt. Während die elementaren Mechanismen beim Hör- und Sehvorgang bereits seit mehreren Jahrzehnten entschlüsselt sind und die Entdeckungen bereits in den 1970ern mit Nobelpreisen für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet worden sind, wurde diese höchste Auszeichnung erst im Jahr 2004 an Wissenschaftler der Olfaktorik verliehen. Damit honorierte das Nobelpreiskomitee den außergewöhnlichen Beitrag von Linda Buck und Richard Axel zur Erforschung der Geruchsrezeptoren und der Organisation des olfaktorischen Systems aus den 1990er Jahren. Die Grundlagenforschung im Bereich der olfaktorischen Neurowissenschaften stellt daher einen noch relativ jungen Forschungsbereich mit vielen interessanten, noch ungeklärten Fragestellungen dar.

Der Geruchssinn ermöglicht die Identifikation und Beurteilung von Nahrung, und unterstützt den Geschmackssinn bei der Wahrnehmung von Aromen. Weiterhin dient das Riechen der Erkennung von Gefahren und dem Meiden von potentiellen Toxinen. In der Tierwelt entfaltet sich das Erkennungsspektrum dieses sensiblen Systems immens. Tiere identifizieren durch das olfaktorische System Freund und Feind, Geschlecht und darüber hinaus den genetischen- und den Reproduktionstatus potentieller Partner (Mombaerts, 2004a; Munger et al., 2009). Die Fähigkeit des Geruchssinnes, verschiedenste chemische Stoffe zu erkennen, macht ihn zu einem außergewöhnlichen Sensor der Außenwelt. Dass bis zu 4% des Genomes für Proteine des Geruchssinnes kodieren, reflektiert auch auf molekularer Ebene dessen außerordentliche Bedeutung für Lebewesen (Firestein, 2001). Lange galt die

Annahme, dass Menschen mit ihrer Rezeptorausstattung mehrere Tausend Duftstoffe unterscheiden können. Kürzlich zeigten Bushdid et al. (2014) jedoch, dass Menschen in der Lage sind, diverse Duftstoffmixturen zu differenzieren und kalkulierten daraus, dass das Geruchssystem des Menschen potentiell die Fähigkeit besitzt, mehr als 1 Billion Duftstoffe zu diskriminieren (Bushdid et al., 2014).

Etabliert hat sich eine Trennung des olfaktorischen Systemes in ein hauptolfaktorisches (main olfactory system, MOS) und ein akzessorisches olfaktorisches System (AOS), wobei weitere Subsysteme sowohl innerhalb als auch außerhalb des MOS und AOS bekannt sind (siehe Abbildung 1) (Breer et al., 2006; Munger et al., 2009). Die Klassifikation der Systeme beruht auf der unterschiedlichen Anatomie, Rezeptorausstattung, Signaltransduktionskaskaden und Verschaltung in höhere Zentren. Trotz dieser Teilung stellen beide Systeme in vielerlei Hinsicht ein überlappendes und ineinandergreifendes Funktionssystem dar, welches chemische Signale komplex verarbeitet (Restrepo et al., 2004; Spehr et al., 2006; Zufall and Leinders-Zufall, 2007).



**Abbildung 1:** Das olfaktorische System der Maus besteht aus mehreren Subsystemen. Zum hauptolfaktorischen System gehören das hauptolfaktorische Epithel (MOE) und der hauptolfaktorische Bulbus (MOB). Das Vomeroneasalorgan (VNO) gehört wie der akzessorische olfaktorische Bulbus (AOB) zum akzessorischen olfaktorischen System. Das Grüneberg-Ganglion (GG) und das septale Organ von Masera (SO) stellen weitere Subsysteme dar.  
*Modifiziert nach Spehr et al. (2006).*

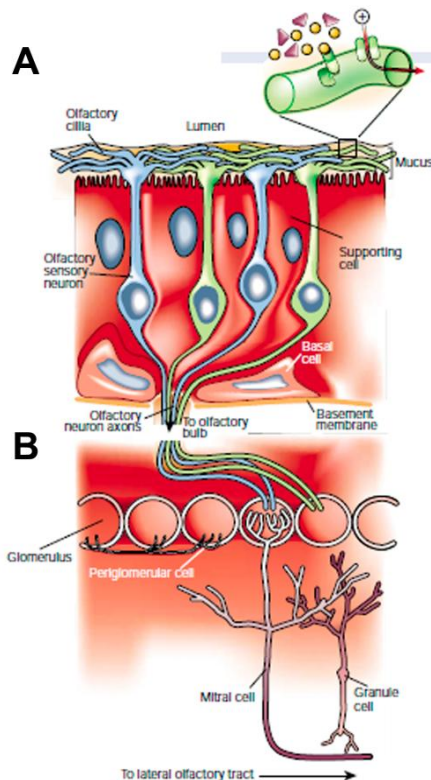
## 2.2 Das hauptolfaktorische System

### 2.2.1 Funktion und Anatomie

Das MOS kann ein enormes Spektrum organischer Moleküle aus der Umwelt detektieren. Die primäre Funktion liegt in der Wahrnehmung von volatilen Geruchsstoffen (Munger et al., 2009), wobei auch nicht volatile Moleküle verarbeitet werden können (Spehr, 2006). Durch Unterbindung der physiologischen Verschaltung von der peripheren Chemodetektion zu höheren Zentren im Gehirn kommt es zu drastischen Verhaltensphänotypveränderungen in Mäusen. In unterschiedlichen Untersuchungen von genetisch veränderten Mauslinien zeigte sich eine starke Verringerung bis Abwesenheit von weiblichem Aggressionsverhalten (Wang and Storm, 2011), männlichem Sexual- und Aggressionsverhalten (Wang, 2006) und Flucht- und Kampfverhalten (Mandiyan et al., 2005).

Das Riechepithel (main olfactory epithelium, MOE) stellt den peripheren Geruchssensor des MOS dar und projiziert die Sinnesinformationen über den hauptolfaktorischen Bulbus (main olfactory bulb, MOB) zu höheren olfaktorischen Zentren im Gehirn (Munger et al., 2009). Das MOE bedeckt die Conchae nasales (Nasenmuscheln) und das Septum in der postero-superioren Nasenhöhle. Es beinhaltet neben 6-10 Millionen olfaktorisch sensorischen Neuronen (OSNs) spezielle Stützzellen mit Glia-ähnlicher Homöostase-Funktion und basal gelegene Stammzellen, welche der Regeneration dienen (Firestein, 2001; Getchell, 1986). Die OSNs sind primäre Sinneszellen mit bipolarem Aufbau. Der singuläre Dendrit besitzt peripher eine knopfähnliche Verdickung mit 20-30 unbeweglichen Zilien, welche in den Mucus der Riechschleimhaut ragen. In den Zilien befinden sich die Rezeptoren und Proteine der Signaltransduktionskaskade (Buck and Axel, 1991).

OSNs entsenden dünne, nicht myelinisierte Axone durch die Lamina cribrosa des Siebbeines zum darüber gelegenen MOB. Dort konvergieren hoch selektiv diejenigen OSNs, welche den gleichen Rezeptor exprimieren, in wenigen Neuropil-Netzwerken, genannt Glomeruli. In diesen Glomeruli findet die synaptische Verschaltung der Afferenzen aus dem MOE auf die zweiten Neurone, die sogenannten Mitralzellen, statt (siehe Abbildung 2) (Mombaerts, 1996).



**Abbildung 2:** Das hauptolfaktorische System.

A) Die olfaktorisch-sensorischen Sinneszellen (olfactory sensory neurons, OSNs) sind bipolare Neurone und liegen mit Stützzellen (supporting cells) und basal gelegenen Stammzellen (basal cells) im hauptolfaktorischen Epithel. Die Zilien der OSNs (olfactory cilia) ragen in die Schleimhaut und dienen der Chemodetektion.

B) Die Axone der OSNs (olfactory neuron axons) penetrieren das Siebbein. OSNs, die den gleichen Rezeptor exprimieren projizieren in gemeinsame Glomeruli. Dort findet die Verschaltung auf die Mitralzellen (mitral cells) statt, diese projizieren weiter zum primären Rhinokortex (lateral olfactory tract). Laterale Prozessierung der Geruchsinformation durch periglomeruläre Zellen (periglomerular cells) und Körnerzellen (granule cells).

Aus Firestein (2001), *Nature*.

Die Axone der Mitralzellen projizieren weiter zum primären Rhinokortex (siehe 2.5 Verschaltung olfaktorischer Stimuli in höhere Zentren) (Dulac and Wagner, 2006).

## 2.2.2 Chemorezeptoren

In den Zilien der OSNs befinden sich zur Bindung der Duftstoffe G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Menco et al., 1997). Die olfaktorischen Rezeptoren (ORs) sind in der Lage, eine Vielzahl von volatilen chemischen Molekülen zu erkennen und zu unterscheiden (Firestein, 2001). Mit ungefähr 1000 intakten OR-Genen (1296 Gene, davon circa 20% Pseudogene) stellt die Odorant-Rezeptor-Gen-Familie die größte Gen-Superfamilie im Genom der Nagetiere dar (Zhang and Firestein, 2002). Die „one receptor – one neuron“ Hypothese – welche bisher nicht eindeutig belegt ist – besagt, dass jedes olfaktorisch sensorische Neuron lediglich einen dieser Geruchsrezeptoren exprimiert (Mombaerts, 2004b). Die ORs besitzen

sieben transmembranöse Domänen mit einem extrazellulären Amino-Terminus und einem intrazellulären Carboxyl-Terminus und ähneln damit auf molekularer Ebene den Photorezeptoren (Pace et al., 1985).

Liberles et al. entdeckten im Jahr 2006 die sogenannten „trace amine-associated receptors“ (TAARs), exprimiert in einer Subpopulation von OSNs des MOE. Diese TAARs erkennen volatile Amine, welche im Urin nachgewiesen werden konnten (Liberles and Buck, 2006).

Eine weitere Subpopulation von OSNs, die überwiegend im posterioren MOE lokalisiert ist, exprimiert eine Zellmembran-assoziierte Guanylylzyklase D (guanylyl cyclase-D, GC-D). Im Gegensatz zu den OR und TAAR exprimierenden Neuronen, exprimieren die GC-D Neurone kein  $G\alpha_{olf}$  oder AC III (siehe auch 2.2.3 Signaltransduktion). GC-D Neurone nutzen eine cGMP spezifische Signaltransduktionskaskade und unterscheiden sich durch dieses Merkmal von OR- und TAAR-Neuronen (Leinders-Zufall et al., 2007).

OSNs, die den gleichen Rezeptor an der Zelloberfläche exprimieren, sind willkürlich im MOE verteilt (Ressler et al., 1993), dennoch konvergieren die Axone dieser OSNs in einem oder wenigen Glomeruli im MOB (Liberles and Buck, 2006; Wachowiak and Shipley, 2006). Damit stellen die Glomeruli eine fundamentale Funktionseinheit zur Geruchskodierung dar, die anschließend in höhere Gehirnzentren weitergeleitet wird (Munger et al., 2009).

### 2.2.3 Signaltransduktion

Die Signaltransduktion wird durch Andocken eines Duftstoffes an einen olfaktorischen Rezeptor initiiert. Die chemische Bindung aktiviert in OR-OSNs die Dissoziation des G-Proteins  $G\alpha_{olf}$  in eine GTP-gebundene  $G\alpha$ -Untereinheit und eine  $G\beta\gamma$ -Untereinheit (Belluscio et al., 1998; Jones and Reed, 1989). Die  $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert die Adenylatzyklase III (AC III), ein Enzym das ATP in den second-messenger cAMP umwandelt (Bakalyar and Reed, 1990; Wong et al., 2000). Zyklisches AMP (cAMP) erhöht konzentrationsabhängig die Offenwahrscheinlichkeit von CNG-Kanälen (cyclic nucleotide gated channels), welche einen Einstrom von Natrium- und Kalzium-Ionen zulassen (Kleene,

2008). Einstömende Kalziumionen aktivieren daraufhin den ANO2-Kanal, einen Kalzium-aktivierten-Chlorid-Kanal, der Chlorid-Ionen aus der Zelle herausströmen lässt (Stephan et al., 2009). Billig et al. (2011) zeigten im ANO2-Knockoutmausmodell, dass ANO2 für elektrische Potentialänderungen im Flüssigkeitsphase-Elektroolfaktogramm, nicht jedoch im Luftphase-Elektroolfaktogramm von Bedeutung ist. Da die ANO2-Knockoutmauslinie außerdem keine offensichtlichen olfaktorischen Phänotypveränderungen zeigte, besteht die Annahme, dass der Kalzium-getriggerte Chloridaustrom nicht essentiell für physiologisches Riechverhalten ist (Billig et al., 2011).

Durch den Einstrom von Natrium- und Kalzium-Ionen und den Ausstrom von Chlorid-Ionen kommt es elektrochemisch zur intrazellulären Abnahme des Membranpotentials. Bei Überschreitung des Schwellenpotentials wird ein Aktionspotential (AP) generiert. Das AP breitet sich anschließend entlang des Axons zu den Mitralzellen im hauptolfaktorischen Bulbus aus, wo die synaptische Transmission stattfindet (Kleene, 2008).

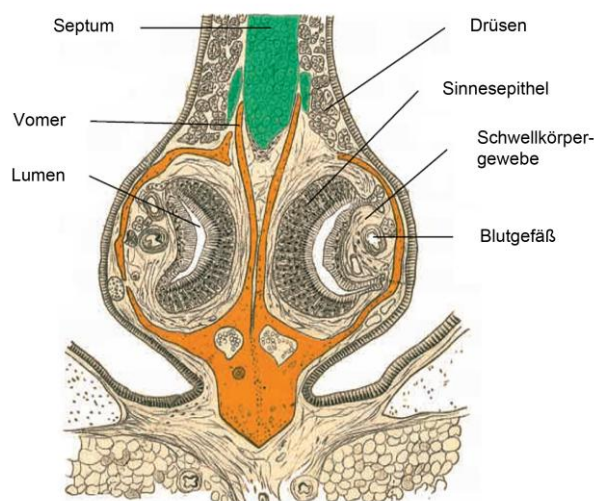
## 2.3 Das akzessorische olfaktorische System

### 2.3.1 Funktion und Anatomie

Viele Säugetiere besitzen neben dem hauptolfaktorischen auch ein akzessorisches olfaktorisches System (AOS). Das Vomeronasalorgan (VNO) stellt im AOS den peripheren Chemosensor dar und dient der Erkennung von „Kommunikationsmolekülen“. Diese chemischen Botenstoffe stammen hauptsächlich aus dem Urin, dem Speichel sowie aus Geschlechtsdrüsen und Tränendrüsen und können spezifische, instinktive, angeborene Verhalten, wie Aggressions- und Sexualverhalten, auslösen. Über Verschaltungen zum Hypothalamus findet ferner eine Modulation des Hormonhaushaltes des Empfängers statt (Liberles, 2014). Im Jahr 1813 beschrieb der dänische Anatom Ludvig Jacobson ausführlich die Anatomie des Vomeronasalorgans (Jacobson Organ). Das paarig auf dem Boden der Nasenhöhle angelegte Organ besitzt eine tubuläre Struktur. Eingeschlossen von einer knorpeligen, teils knöchernen Kapsel liegt das VNO beidseits direkt dem Pflugscharbein (Vomer) beziehungsweise dem nasalen Septum an (Jacobson et al., 1998). Charakteristisch ist das halbmondförmige Lumen, welches im Koronarschnitt zur Geltung kommt (siehe Abbildung 3). Medial in dem nach anterior offenen, schlauchförmigen Organ befindet sich das Neuroepithel. Dort befinden sich die vomeronasalen sensorischen Rezeptor-Neurone (VSNs, vomeronasale Sinneszellen), Stützzellen und Basalzellen. Lateral des Lumens befinden sich ein Schwellkörpergewebe und ein prägnantes Gefäß. Beide bilden zusammen das laterale Kompartiment. Dieses ist außerordentlich stark durch das autonome Nervensystem innerviert. Aktivierung über das Nervensystem induziert Vasokonstriktion respektive Vasodilatation in den Gefäßstrukturen und dadurch eine pumpenähnliche Funktion in diesem Kompartiment. Dadurch soll der Zugang von Pheromonen in das VNO erleichtert werden (Matsuda et al., 1996; Meredith, 1994). Bei Huftieren beispielsweise ist das sogenannte Flehmen ein typisches Verhalten, um Duftstoffe aus der Mundhöhle in das Vomeronasalorgan zu saugen, wodurch die beschriebene pumpenähnliche Funktion unterstützt werden kann. (Müller-Schwarze, 1991). Man vermutet, dass das charakteristische

Anheben der Oberlippe beim Flehmen den Zugang des Ductus nasopalatinus erweitert und so bei der Inspiration eine optimale Stimulusaufnahme in das VNO gewährleistet wird (Ladewig and Hart, 1980). Die VSNs besitzen wie die OSNs einen bipolaren Aufbau. Der apikale Dendrit der VSNs ist jedoch nicht mit Zilien, sondern mit speziellen Mikrovilli-ähnlichen Strukturen ausgestattet, in denen sich die Rezeptor- und Signaltransduktionsproteine befinden. Die Axone der VSNs vereinen sich, laufen in einem Bündel entlang des nasalen Septums, durchbohren das Siebbein und ziehen anschließend zum dorso-posterioren Aspekt des hauptolfaktorischen Bulbus, dem so genannten akzessorischen olfaktorischen Bulbus (AOB) (Munger et al., 2009).

Zusammen mit den Gonadotropin-Releasing-Hormon-Neuronen (GnRH-Neurone) und GABA-Neuronen entwickeln sich die VSNs aus der olfaktorischen Plakode. Die GnRH-Neurone wandern durch den AOB zum medio-basalen Hypothalamus. Diese embryonale Grundlage erklärt die enge funktionelle Zusammengehörigkeit von VNO und Hypothalamus und begründet den Einfluss des akzessorischen olfaktorischen Systems auf neuroendokrine Funktionen und Verhalten (Keverne, 1999).



**Abbildung 3** Koronarschnitt durch das Septum der Nase und beide Vomeronasalorgane, die sich mit einem halbmondförmigen Lumen darstellen. Aus Doving and Trotter (1998).



### 2.3.2 Chemorezeptoren

Die Wahrnehmung von chemischen Stoffen durch das Vomeronasalorgan wird in erster Linie durch zwei nicht überlappende Neuronen Subpopulationen vermittelt. Die VSNs der apikalen, lumenwärts gelegenen Schicht exprimieren Rezeptoren der V1-Rezeptor-Familie (V1R), die VSNs der basalen Schicht hingegen exprimieren Rezeptoren der V2-Rezeptor-Familie (V2R). Diese anatomisch-räumliche Trennung korreliert auch mit der unterschiedlichen Expression von zwei G-Protein-Familien,  $G\alpha_{i2}$  in V1R-Neuronen und  $G\alpha_o$  in V2R-Neuronen. Weiterhin bilden Axone der apikalen V1R-VSNs Synapsen in der anterioren Hälfte des AOB, die Axone der basalen V2R-VSNs hingegen in der posterioren Hälfte des AOB (Munger et al., 2009). Auch auf höhere Ebene wird diese anatomische Segregation zumindest zum Teil aufrechterhalten. Anteriorer und posteriorer AOB projizieren jeweils zu unterschiedlichen spezifischen Bereichen der Amygdala (siehe auch 2.5 Verschaltung olfaktorischer Stimuli in höhere Zentren) (Mohedano-Moriano et al., 2007).

### 2.3.3 V1R

Die Vomeronasal-1-Rezeptor (V1R) exprimierenden Vomeronasalneurone (V1R-VSNs) sind fein abgestimmte, hochspezifische Sinneszellen. Insgesamt gibt es 187 intakte V1r Gene, deren Transkription in monogener, monoallelischer Weise vorkommt. V1R-VSNs koexprimieren das G-Protein  $G\alpha_{i2}$ . Dieses gehört zur Klasse A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ähneln damit dem Rhodopsin. Ein relativ kurzer extrazellulärer Aminoterminus fungiert wahrscheinlich als Bindungsstelle für Liganden (Chamero et al., 2012; Munger et al., 2009).

Mittels Koexpression des Grün-fluoreszierenden Proteines (GFP) in V1rb2-Neuronen konnten Boschat et al. (2002) in Einzelzellexperimenten die Eigenschaften des V1rb2-Rezeptors analysieren. Die Autoren identifizierten 2-Heptanon – ein Pheromon aus dem männlichen Urin – als hochspezifischen, im nanomolaren Bereich hochsensitiv-detektierbaren Agonisten (siehe auch 2.6.2 Volatile Urinduftstoffe). Mit dieser Publikation

wurde das bisher erste identifizierte Rezeptor-Agonist-Paar im Vomeronasalorgan beschrieben (Boschat et al., 2002).

Dass die Rezeptor Aktivierung hochspezifisch für bestimmte Pheromone ist, konnte bereits im Jahr 2000 dargestellt werden. Eine Erhöhung der Stimuluskonzentration um ein Vielfaches konnte das Bindungsspektrum eines VSN in den durchgeführten Experimenten nicht auf zusätzliche Liganden erweitern (Leinders-Zufall et al., 2000). Diese hochspezifische Aktivierung der Neurone durch Pheromone war Grundlage für die Annahme, dass ein Defekt im V1r-Gencluster zu charakteristischen Verhaltensveränderungen bei Mäusen führt. In einer Mauslinie, in der ungefähr 12% des V1r-Repertoires (16 V1r-Gene: Cluster V1ra und V1rb) mittels Chromosome Engineering herausgeschnitten wurden, konnten einige Liganden wie Isobutylamin keine Feldpotentiale mehr im Elektrovomeronasogramm (EVG) auslösen. Spezifische Verhaltensweisen wie männliches Sexualverhalten und maternales Aggressionsverhalten wurden ebenfalls untersucht. Beide waren in der genetisch veränderten Mauslinie signifikant reduziert (Del Punta et al., 2002).

Zahlreiche volatile Moleküle (siehe auch 2.6.2 Volatile Urinduftstoffe) und sulfatierte Steroide (siehe auch 2.6.7 Steroidderivate) aus dem Urin sind die bisher bekannten, prototypischen Agonisten der V1R-VSNs (Isogai et al., 2011; Leinders-Zufall et al., 2000).

#### **2.3.4 V2R**

Die Vomeronasal-2-Rezeptor (V2R) exprimierenden vomeronasalen Sinneszellen (V2R-VSNs) detektieren unterschiedliche Peptide und Proteine, welche ebenfalls eine essentielle Rolle in der chemischen Kommunikation und damit in der Regulation von Sozialverhalten spielen. Die V2R-VSNs koexprimieren  $G\alpha_o$ , ein G-Protein der Klasse C, welches dem metabotropem Glutamatrezeptor ähnelt. Im Gegensatz zu den V1R-VSNs zeichnen sich V2R-VSNs auf molekularer Ebene durch einen großen extrazellulären Aminoterminus aus (Chamero et al., 2012).

Phylogenetisch werden die 122 intakten V2r Gene anhand ihrer Sequenzhomologie in vier

Familien (V2ra - V2rd) unterteilt: insgesamt 115 Gene der Familien A,B und D und 7 Gene der Familie C. Ishii und Mombaerts (2011) zeigten, dass in V2R-VSNs ein Gen der Familie C mit einem Gen aus den Familien A, B oder D koexprimiert wird. Die Autoren vermuten eine sequentielle und von Familie A, B oder D abhängige Expression der Familie-C Gene. Diese koordinierte Koexpression könnte durch anschließende Heterodimerisierung des V2R zur Spezifität der V2-Rezeptorneurone beitragen (Ishii and Mombaerts, 2011). Damit weichen V2R-VSNs von der im MOS und in V1R-VSNs geltenden „one receptor – one neuron“ Hypothese ab (Mombaerts, 2004b).

Ein Teil der V2R-VSNs koexprimiert Proteine einer weiteren Multigenfamilie, der sogenannten H2Mv-Genfamilie. Diese H2Mv erhielten ihren Namen von ihrer Chromosomenlokalisierung: dem H2-M Locus. Dieser ist der am weitesten distal gelegene Genabschnitt der MHC-Klasse I Gene und kodiert für die nicht klassischen MHC-Moleküle der Klasse Ib (Ishii et al., 2003). Auch Loconto et al. (2003) beschrieben die Entdeckung der Expression von M1 und M10 Familien des H2-Locus. Sie arbeiteten mit Zellkulturen aus Spermatogonien und zeigten, dass die Kotransfektion von M10 und beta-2-Mikroglobulin ( $\beta 2m$ ) mit einem V2-Rezeptor zu einer verstärkten Oberflächenexpression führte. Es wurde geschlussfolgert, dass die Interaktion von V2R und M10s eine Rolle bei der zielgerichteten Expression an der Membranoberfläche spielen, und dass H2-M10 Proteine als Escortmoleküle fungieren (Loconto et al., 2003).

Ishii und Momaberts (2008) zeigten, dass anhand des H2Mv-Expressionsmusters die basale Nervenzellschicht der V2R-Neurone räumlich-anatomisch unterteilt werden kann. Während die basalen V2R-Neurone  $G\alpha_o$  positiv und H2Mv positiv sind, exprimieren die apikalen V2R Neurone die H2Mv Gene nicht. Vergleichbar mit der klassischen Zweiteilung des VNO und der Fortsetzung bis in den AOB setzt sich auch diese neue Dreiteilung auf höheren Ebenen fort. Die Axone der apikalen H2Mv negativen V2R-VSNs projizieren zum anterioren Teil des posterioren AOB, und die basalen H2Mv positiven V2R-VSNs zum posterioren Teil des posterioren AOB (Ishii and Mombaerts, 2008).

Das bisher bekannte Ligandenspektrum der V2R-VSNs umfasst Proteine und Peptide wie

MUPs, ESP1 und MHC-Peptide (siehe auch 2.6.3, 2.6.4 und 2.6.5). Diese werden vor allem über den Urin beziehungsweise die Tränenflüssigkeit vom Empfänger an die Außenwelt abgegeben (Chamero et al., 2012). Ein direkter physischer Kontakt zwischen Stimulus und Nase des Empfängers ist notwendig, damit die Liganden das Vomeronasalorgan erreichen (Luo, 2003).

### 2.3.5 FPR

Mäuse exprimieren mindestens sieben verschiedene Formyl-Peptid-Rezeptoren (FPRs): mFpr1 und mFpr2 (auch *mFpr-rs2*) und fünf weitere mFpr-rs (mFpr-rs1, -rs3, -rs4, -rs6, -rs7). MFpr1 und mFpr2 werden wie die drei humanen FPRs (hFPR1, hFPR2, hFPR3, auch als FPR1, FPRL1, FPRL2 bezeichnet) vor allem von Immunzellen, wie neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert und unterstützen das Immunsystem bei der Abwehr von Pathogenen durch Induktion von Chemotaxis, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und die Freisetzung proteolytischer Enzyme. Die insgesamt sieben verschiedenen murinen Formyl-Peptid-Rezeptoren wurden aber auch in weiteren Geweben wie Milz, Lunge, Leber, Muskel, Gehirn, Testikel, Herz und Pankreas nachgewiesen, sodass weitere, bisher unbekannte Funktionen angenommen werden (Bufe et al., 2012; Gao et al., 1998; Migeotte et al., 2006; Panaro et al., 2006).

Das prototypische Ligandenspektrum der FPRs umfasst formylierte Peptide aus Bakterien und Mitochondrien, aber auch vielfältige andere Krankheits-assoziierte Moleküle und synthetische Agonisten sind identifiziert worden (Migeotte et al., 2006). Im Jahr 2009 veröffentlichten zwei Arbeitsgruppen die Entdeckung der Expression der fünf mFpr-rs im VNO. Diese kodieren wie auch die V1R und V2R für heptahelikale Transmembranproteine. Sie werden monogen exprimiert und mFpr-rs-exprimierende VSNs exprimieren keine weiteren mFpr-rs oder V1r- respektive V2r-Gene (Rivière et al., 2009).

Sensorische Neurone, die mFpr-rs3, -rs4, -rs6 oder -rs7 exprimieren, koexprimieren das G-Protein  $G_{i2}$ , wohingegen mFpr-rs1-VSNs  $G_{\alpha_o}$  koexprimieren (Liberles et al., 2009; Rivière

et al., 2009).

Rivière et al. (2009) untersuchten bekannte FPR-Liganden humaner Immunzellen als potentielle Agonisten der mFpr-rs im VNO. Das formylierte Tripeptid f-MLF wurde von mFpr-rs-3, -rs4, -rs6, -rs7 exprimierenden VSNs detektiert, nicht jedoch von  $G\alpha_o$ -positiven mFpr-rs1-VSNs (Rivière et al., 2009). Bufe et al. (2012) exprimierten sowohl die drei humanen als auch die sieben murinen FPRs in einem *in vitro* Assay und erweiterten die Ligandensuche. Sie beobachteten eine ausgesprochen funktionelle Konservierung des Bindungsspektrums von FPR1 und FPR2 in Mensch und Maus. Im Vergleich der Agonistenprofile von mFpr1 und mFpr2 mit dem der vomeronasalen mFpr-rs zeigten sich jedoch elementare Unterschiede. Das Tripeptid f-MLF aktivierte lediglich mFpr1 und mFpr2, nicht jedoch mFpr-rs, sodass die Beobachtungen von Rivière et al. (2009) nicht bestätigt werden konnten (Bufe et al., 2012; Rivière et al., 2009). Diskutiert wurden in diesem Zusammenhang unbekannte Kofaktoren der *in vivo* Rezeptor-Liganden-Interaktion. Verantwortlich sein könnten beispielsweise das Zellmembranprotein CD38 oder der Scavenger-Rezeptor MARCO (Bufe et al., 2012).

### 2.3.6 Signaltransduktion

Die Signaltransduktionskaskade der VSNs ist noch weitestgehend unbekannt. Verschiedene, teils aufeinander aufbauende und teils parallel existierende Modelle sind in der Literatur aufgeführt. Erwiesen ist bisher, dass die Signaltransduktions-Moleküle der OSNs nicht im VNO exprimiert werden, und sich somit die Signaltransduktionskaskaden der beiden olfaktorischen Systeme unterscheiden (Liman and Corey, 1996).

Die G-Proteine  $G\alpha_{i2}$  und  $G\alpha_o$  sind die quantitativ am höchsten exprimierten G-Proteine im VNO und in immunhistochemischen Färbungen in den apikalen respektive basalen VSNs lokalisiert. Weitere G-Proteine wie  $G\alpha_s$  oder  $G\alpha_{q11}$  werden entweder nur schwach oder variabel exprimiert (Berghard and Buck, 1996). Die anatomische Trennung der G-Protein-Expression in VSNs wird auch bei der Verschaltung auf die zweiten Neurone im

akzessorischen olfaktorischen Bulbus aufrechterhalten.  $G\alpha_{i2}$ - und  $G\alpha_o$ -VSNs projizieren zum anterioren respektive zum posterioren AOB (Jia and Halpern, 1996).

Da die Stimulation von VSNs in Strumpfbandnattern eine Akkumulation des second-messenger Inositol-1,4,5-Triphosphat ( $IP_3$ ) induzierte (Luo et al., 1994), untersuchten Inamura et al. (1997) die Wirkung einer  $IP_3$ -Inhibitor-Applikation. Sowohl die Blockade des  $IP_3$  als auch die Blockade der vorgeschalteten Phospholipase C (PLC) verhinderten eine Aktivierung der VSNs durch Urin, sodass eine  $IP_3$ -abhängige Signaltransduktion in den vomeronasalen Sinneszellen vermutet wurde (Inamura et al., 1997).

Aktivierung von VSNs führt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration. Dieser Anstieg ist ausschließlich abhängig vom Vorhandensein von ausreichend extrazellulärem Kalzium; experimentelle intrazelluläre Kalziumspeicher-Depletion verhinderte nicht die Aktivierungsfähigkeit. Spehr et al. (2002) konnten auch zeigen, dass die PLC und die DAG-Lipase essentiell an dem intrazellulären Kalziumanstieg beteiligt sind. PLC- und DAG-Lipase-Inhibition blockierten eine Urin induzierte Aktivierung der VSNs. In ihren Experimenten konnten sie eine gleichartige Wirkung durch  $IP_3$ - und Proteinkinase C- (PKC) Inhibition jedoch nicht erzielen. Da die DAG-Lipase endogenes DAG zu mehrfach ungesättigten Fettsäure Metaboliten (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) umsetzt, wurden anschließend Messungen mit Vertretern der PUFAs wie Arachidonsäure (arachidonic acid, AA) durchgeführt. AA war in der Lage – auch bei simultaner Stimulation mit dem PLC-Inhibitor – nach einer Verzögerung von ungefähr 25 Sekunden einen transienten intrazellulären Kalziumanstieg zu induzieren, sodass ein der PLC-nachgeschalteter Mechanismus vermutet wird (Spehr et al., 2002).

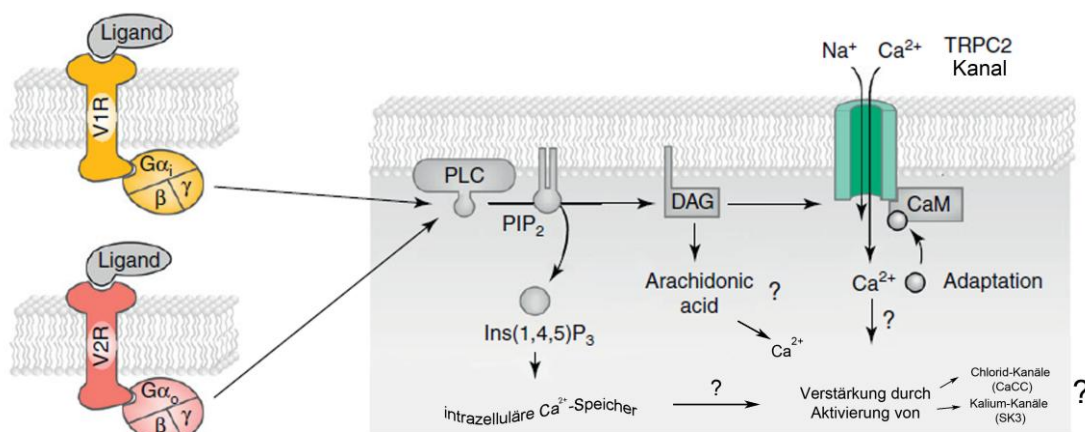
Elektrophysiologische Untersuchungen in VSNs erbrachten keine Hinweise für Signaltransduktionsmechanismen, die abhängig sind von zyklischen Nukleotiden. Dementsprechend konnte eine dem MOE-ähnliche Signaltransduktionskaskade vorerst ausgeschlossen werden. Genetische Analysen aus der Phototransduktion der Fliege (*Drosophila*) und der chemischen Kommunikation des Fadenwurms (*Caenorhabditis elegans*) hatten eine entscheidende Rolle des Transient-Rezeptor-Potential-Kanals TRPC2

(nach alter Nomenklatur auch als TRP2 bekannt) in deren Signaltransduktion identifiziert (Liman and Corey, 1996). Genetische Analysen im VNO zeigten eine starke Expression von TRPC2 in den Mikrovilli, welche eine Funktion in der Signaltransduktion vermuten ließ (Liman et al., 1999).

Im Jahr 2002 publizierten zwei Arbeitsgruppen (Leypold et al., 2002 und Stowers et al., 2002) sowohl die elektrophysiologischen als auch die verhaltenstechnischen Charakteristika von TRPC2-defizienten Mäusen. In den elektrophysiologischen Untersuchungen waren Antworten auf bekannte chemische Liganden signifikant reduziert (Leypold et al., 2002) beziehungsweise nicht mehr auslösbar (Stowers et al., 2002). In den Verhaltensexperimenten zeigten Männchen kein Aggressionsverhalten gegenüber Eindringlingen (Resident-Intruder-Assay). Außerdem waren die Männchen scheinbar nicht mehr in der Lage, das Geschlecht zu identifizieren, da es zu regelmäßigen Paarungsversuchen sowohl mit weiblichen als auch mit männlichen Artgenossen kam. Im Gegensatz zu den Angaben von Stowers et al. (2002) zeigten sich bei den Verhaltensexperimenten von Leypold et al. (2002) jedoch trotz eingeschränkter Geschlechtsdiskrimination eine Tendenz zum Paarungsversuch mit Weibchen (Leypold et al., 2002; Stowers et al., 2002).

Lucas et al. (2003) gelang schließlich die Verbindung von zwei bis dahin einzelnen Schlüsselmechanismen der Signaltransduktion im VNO. Die Arbeitsgruppe identifizierte einen Kalzium-Kanal in vomeronasalen Dendriten, der durch den second-messenger DAG geöffnet wird. In TRPC2-defizienten Mäusen war dieser DAG-geöffnete Kanal jedoch defekt. Dies bedeutete, dass das TRPC2-Gen für eine wesentliche Untereinheit des DAG-abhängigen Kalzium-Kanals kodiert und damit DAG den entscheidenden second-messenger für die Pheromon-Antwort darstellt. Im Gegensatz zu Spehr et al. (2002) konnte der PLC-Inhibitor in den Experimenten von Lucas et al. (2003) die Pheromon-induzierte Antwort nicht blockieren. Diskutiert wurden in diesem Zusammenhang die unterschiedlichen Techniken, die benutzt wurden (Kalzium-Imaging gegen Elektrophysiologie) (Lucas et al., 2003).

VSNs reagieren auf Stimulation mit einem Anstieg des intrazellulären Kalziums. Dieser Anstieg triggert daraufhin einen Chlorid-Ionen-Ausstrom und amplifiziert damit das elektrische Signal in den VSNs (Yang and Delay, 2010). Ausführliche Untersuchungen des Chlorid-Ionen-Stromes entlang der Zellmembran von VSNs zeigten, dass in Wildtypmäusen Chlorid-Ionen 70% und TRPC2 30% des generierten Ionenstromes als Antwort auf Urin tragen. Durch Blockade des Chlorid-Ionen-Stromes waren die VSNs nicht mehr erregbar. In TRPC2-defizienten Mäusen hingegen zeigten sich die Ströme auf 50% reduziert, woraus sich synergistische Effekte aus intra- und extrazellulärem Kalzium auf die Chloridleitfähigkeit ableiten lassen (Kim et al., 2011).



**Abbildung 4:** Signaltransduktionsmodell der V1- und V2-Rezeptorneurone. Etabliert ist bisher, dass nach Dissoziation des aktivierten G-Proteins die Phospholipase C (PLC) aktiviert wird. Diese spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>). DAG stimuliert den Kationeneinstrom über TRPC2, während Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> intrazelluläre Kalziumspeicher öffnet. Arachidonsäurederivate (arachidonic acid) sind in der Lage verzögerte Kalziumkonzentrationsanstiege zu induzieren. Der Anstieg des intrazellulären Kalziums stimuliert sowohl Kalzium-abhängige-Chlorid-Kanäle (CaCC) als auch Kalzium-abhängige-Kalium-Kanäle (SK3), welche die Aktivierung der Sinneszellen amplifizieren. Der Komplex aus Kalzium und Calmodulin (CaM) entsteht konzentrationsabhängig und inhibiert als Adaptationsmechanismus den Kationeneinstrom über TRPC2. *Modifiziert nach Chamero et al. (2012).*

Neben TRPC2 und Kalzium-aktivierten-Chlorid-Kanälen (CaCC) wurden ein Kalzium-



aktivierter- (SK3) und ein G-Protein-aktivierter- (GIRK) Kalium-Kanal als Teil der Signaltransduktionskaskade identifiziert. Kim et al. (2012) verglichen den paradoxen Kalium-Ionen-Einstrom mit der Signalübertragung der Sinneszellen im Innenohr, wo ein hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen zum Einstrom von Kalium-Ionen in die Zellen hinein führt. Verhaltenstests sowohl in SK3- als auch in GIRK-defizienten Mäusen zeigten ein signifikant reduziertes Aggressionsverhalten und ein reduziertes Paarungsverhalten bei sexuell unerfahrenen Knockout-Mäusen. Diese Studie unterstützte ein Signaltransduktionsmodell, in dem TRPC2, CaCC, SK3 und GIRK an der *in vivo* Depolarisation von VSNs beteiligt sind (Kim et al., 2012).

Wie andere Sinneszellen auch besitzen Neurone im olfaktorischen System bestimmte Adaptationsmechanismen. Diese Adaptationsmechanismen sind erforderlich, um die Sensitivität für die Stimulusaktivierung der Rezeptorneurone zu modulieren. Prolongierte und repetitive Stimulierungen von VSNs führen über Kalzium-Ioneneinstrom durch den TRPC2-Ionenkanal zur Bildung von Kalzium-Calmodulin-Komplexen ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM). Diese Komplexe binden und inhibieren TRPC2 und stellen so einen negativen Feedbackmechanismus in der Signaltransduktionskaskade der VSNs dar (siehe Abbildung 4) (Spehr et al., 2009).

### 2.3.7 Mögliche Funktionen von H2Mv

Obwohl bereits im Jahr 2003 zwei Arbeitsgruppen die Expression der nicht klassischen MHC-Moleküle in den basalen V2R-VSNs beschrieben, ist über die *in vivo* Funktion bisher nichts bekannt. Einige Hypothesen konnten bisher jedoch stellenweise untermauert beziehungsweise entkräftet werden:

#### *H2Mv Expression nach der Embryonalperiode*

Während der Embryonalzeit ist die H2Mv Expression in den entsprechenden V2R-Subpopulationen noch nicht aktiv. Die ersten H2Mv RNA-Transkripte in vomeronasalen Sinneszellen sind eine Woche nach Geburt der Maus detektierbar und die Zahl der H2Mv exprimierenden V2R-VSNs steigt dann stetig bis zum Erwachsenenalter an, in dem

schließlich ungefähr die Hälfte der V2R-VSNs H2Mv koexprimieren. Diese späte Expression spricht gegen eine übergeordnete Rolle von H2Mv in der Embryologie des Vomeronasalorgans und lässt eher eine Funktion für reife vomeronasale V2R-Sinneszellen vermuten (Ishii et al., 2003; Loconto et al., 2003).

### *Die Funktion von H2Mv im zentralen Nervensystem*

Im frühen Entwicklungsstadium des Gehirns differenzieren sich am kranialen Ende des Neuralrohres die Hirnbläschen und aus dem Zentralkanal entwickelt sich das Ventrikelsystem des Gehirns. In der subventrikulären Zone des Seitenventrikels befindet sich im nativen Gehirn eine Ansammlung von Progenitor-Zellen des Nervensystems, die sich später in Neurone und Gliazellen differenzieren. Dass MHC-Moleküle sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten zentralen Nervensystem (ZNS) von Mäusen exprimiert werden, ist von Liu et al. (2013) gezeigt worden. In der frühen Entwicklung ist die MHC-Expression in Zellen im Bereich der subventrikulären Zone des Seitenventrikels lokalisierbar, später im zerebralen Kortex, Aquädukt und Zerebellum und nach der Geburt im olfaktorischen Bulbus, Hippocampus, Zerebellum und einigen Kerngebieten von Hirnnerven (Liu et al., 2013). Obwohl die Funktion der MHC-Moleküle im ZNS noch weitestgehend unbekannt ist, konnten einige Studien zeigen, dass die Expression von MHC für die Entwicklung von Nervenzellen und für die neuronale Plastizität eine wichtige Rolle spielen (Shatz, 2009): Axone retinaler Ganglienzellen ziehen als Tractus opticus in das Kerngebiet des Corpus geniculatum laterale (CGL) und werden dort synaptisch auf die Radiatio optica verschaltet, welche anschließend in die primäre Sehrinde verläuft. Die postnatale Aktivität der Sehbahn reguliert die MHC-Expression dieser CGL-Neurone während der entscheidenden Phase der finalen Remodellierung der synaptischen Verschaltung zwischen Retina- Ganglienzellen und den CGL-Neuronen. Experimentelle Blockade der CGL-Neurone führte zu einer reduzierten MHC-Expression in diesen Neuronen. Vermutet wurde in diesem Zusammenhang daher eine Funktion für MHC bei der neuronalen Verschaltung und aktivitätsabhängigen Konnektivität (Corriveau et al., 1998). Experimente in einer genetisch veränderten Mauslinie mit einer CD3-Defizienz, einer MHC I Untereinheit, konnten die

vermutete Beeinträchtigung bei der Ausreifung dieser Synapsen illustrieren (Huh et al., 2000). Ishii et al. (2008) identifizierten M10.2, eines der neun postnatal exprimierten H2Mv Gene, in axonalen Enden von V2R-Sinneszellen, sodass auch hier eine Funktion bei der Ausreifung von Synapsen zwischen vomeronasalen Sinneszellen und Mitralzellen im akzessorischen olfaktorischen Bulbus denkbar waren, bisher aber nicht untersucht werden konnten, da eine H2Mv-defiziente Mauslinie zur Untersuchung dieser Hypothese nicht existierte (Ishii and Mombaerts, 2008).

### *Eine mögliche Funktion von H2Mv bei der Antigenpräsentation?*

MHC-Moleküle der Klasse I werden in drei Gruppen gegliedert: (i) klassische MHC-Moleküle, die auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, (ii) nicht klassische MHC-Moleküle, welche nur von bestimmten Zelltypen exprimiert werden und (iii) nicht exprimierte Pseudogene. Die klassischen MHC-Moleküle der Klasse Ia werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und besitzen einen ausgesprochen hohen Polymorphismus. Sie haben eine entscheidende Funktion im Immunsystem. Sie präsentieren an der Zelloberfläche Peptidfragmente aus dem Proteasom, sogenannte MHC-Peptide oder MHC-Antigene, die vom T-Zell-Rezeptor CD8+-zytotoxischer T-Zellen erkannt werden. Bei Erkennung zellfremder Strukturen wird dann die Apoptose induziert (Bjorkman and Parham, 1990; Ploegh et al., 1981). Die Funktion der nicht klassischen MHC-Moleküle der Klasse Ib ist jedoch weitestgehend noch unbekannt. H2-M3 Moleküle gehören zu den nicht klassischen MHC-Molekülen der Klasse Ib und sind wie die MHC-Klasse Ia in der Lage, Peptidfragmente zu präsentieren. Sie spielen eine noch nicht vollends entschlüsselte Rolle in der adaptiven Immunabwehr. H2-M3 besitzt eine hohe Affinität für n-formylierte Peptide, die entweder von endogenen mitochondrialen Proteinen oder von Bakterien stammen (Adams and Luoma, 2013; Lindahl et al., 1997). Nach Infektion einer Zelle werden die im endoplasmatischen Retikulum zurückgehaltenen, unbeladenen H2-M3 Moleküle rasch mit formylierten Peptiden beladen und anschließend auf der Zelloberfläche präsentiert. Dieses wurde beispielsweise für *Listeria monocytogenes*- als auch *Mykobakterium tuberculosis*-Infektionen gezeigt (Chun et al., 2001; Kurlander et al., 1992; Pamer et al., 1992). Neben den bakteriellen Peptiden

besitzen die mitochondrialen ND1- und COI- kodierten Peptide eine äußerst starke Affinität für H2-M3, gefolgt von den elf anderen mitochondrial kodierten Peptiden. Vermutlich fungieren die mitochondrialen Peptide ebenfalls im Sinne der Wirtsabwehr der Zelle (Chiu et al., 1999; Mir and Sharma, 2013; Shawar et al., 1995). Ob H2Mv der vomeronasalen Sinenzellen ebenfalls Peptidfragmente von Mitochondrien oder Bakterien präsentiert, ist bisher unbeantwortet. Fest steht, dass im VNO die Transportproteine TAP-1 und TAP-2 nicht exprimiert werden. Diese dienen dem Transport von Peptidfragmenten aus dem Proteasom zum endoplasmatischen Retikulum, wo die Beladung der MHC-Moleküle stattfindet, bevor diese auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Loconto et al., 2003).

Olson et al. (2005) untersuchten die Kristallstruktur von M10.5, einem der neun H2Mv Gene. Sie zeigten, dass die Kristallstruktur der von klassischen MHC-Molekülen stark ähnelt. Die Bindungstasche von M10.5 zeigte sich jedoch offen und unbesetzt. Endogene Peptide waren nicht in der Lage, mit M10.5 zu interagieren. Die geringe thermale Stabilität ließ die Autoren der Studie aber vermuten, dass die Bindungstasche unter physiologischen Bindungen mit bisher nicht identifizierten Peptiden besetzt ist beziehungsweise besetzt werden kann (Olson et al., 2005).

## 2.4 Weitere olfaktorische Subsysteme

Das septale Organ von Masera (SOM) ist eine kleine Insel mit olfaktorischem Epithel, die sich außerhalb des MOE im Bereich des ventralen Septums in der Nähe des Ductus nasopalatinus befindet (siehe auch Abbildung 1). Es besitzt im Gegensatz zu den 6-8 Nervenzellschichten im MOE nur 1-3 Nervenzellschichten (Munger et al., 2009). Die Hauptsignaltransduktionsmoleküle und -mechanismen entsprechen dem des MOE. Die OSNs im SOM exprimieren identische ORs,  $G\alpha_{olf}$  und AC III (Ma et al., 2003). Neben einer chemorezeptiven wurde auch eine mechanosensitive Funktion angenommen. Beide Funktionen vermitteln ihre Informationen über die gleichen Signaltransduktionselemente (Grosmaître et al., 2007).

Im Jahr 1973 beschrieb Hans Grüneberg ein Ganglion in der Mukosa der Nase, welches er im Rahmen von Untersuchungen von nasalen und anderen exokrinen Drüsen zufällig entdeckte (Grüneberg, 1973). Das Grüneberg-Ganglion (GG) liegt im Bereich der Nasenspitze (siehe auch Abbildung 1) und seine Axone projizieren zum hauptolfaktorischen Bulbus. Die biologische Funktion ist bis auf wenige Ansätze noch unbekannt, vor allem weil keine Verbindung der Neurone zum nasalen Lumen besteht und somit eine Stimulusaktivierung noch ungeklärt ist. Brechbühl et al. (2008) untersuchten die Vermittlung von Alarmpheromonen über das GG. Bestimmte Alarmpheromone sind in der Lage, intrazelluläre Kalziumkonzentrationsanstiege in GG-Nervenzellen zu evozieren. Diese Aktivierung korrelierte mit dem Verhaltensphänotyp. Mäuse offenbarten Erstarrungsverhalten bei Wahrnehmung der Alarmpheromone, welches nach Axotomie und anschließender Degeneration des GG verschwand (Brechbühl et al., 2008). Schmid et al. (2010) zeigten, dass GG-Neurone auf Kälte-Stimulation reagieren können und etablierten damit eine Temperatursensor-Funktion der GG-Neurone (Schmid et al., 2010).

## 2.5 Verschaltung olfaktorischer Stimuli in höhere Zentren

Mitralzellen aus dem MOB projizieren hauptsächlich in die primäre Riechrinde, bestehend aus dem piriformen Kortex, dem Tuberculum olfactorium, dem Nucleus corticalis amygdalae und dem entorhinalen Kortex (Shipley and Ennis, 1996). Das VNO hingegen verschaltet eingehende Informationen über Mitralzellen aus dem AOB direkt zum limbischen System, vor allem zur Amygdala. Die anatomische und funktionelle Trennung eingehender Information in apikale und basale VSNs wird auch nach Verschaltung in den anatomisch getrennten Regionen des akzessorischen olfaktorischen Bulbus partiell aufrechterhalten. Stimuli der V1R-VSNs werden vor allem in Kern-Untergruppen des Nucleus striae terminales verarbeitet. Die mediale Amygdala verarbeitet hingegen bevorzugt Stimuli der V2R-VSNs (Mohedano-Moriano et al., 2007).

Von der medialen Amygdala und dem postero-kortikalen Nucleus der Amygdala – zusammen auch vomeronasale Amygdala genannt – findet eine weitere synaptische Verschaltungen zum Hypothalamus und den dort befindlichen GnRH-Neuronen statt. Vom VNO erkannte Pheromone können über diese Verschaltung Einfluss auf spezifische Verhalten nehmen, denn das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) der Hypothalamus-Hypophysen-Achse ist einer der Hauptregulatoren im neuroendokrinen System der Reproduktion (Boehm et al., 2005). Auch das MOS nimmt Einfluss auf die GnRH-Regulation. Das hauptolfaktorische System kann sowohl die Synthese als auch die Ausschüttung von GnRH modulieren. Dieses wird über Aktivierung von spezifischen Neuronensubpopulationen im MOE initiiert und das Signal über direkte Afferenzen aus dem MOE über den MOB zu den GnRH-Neuronen vermittelt (Yoon et al., 2005).

## 2.6 Pheromone

### 2.6.1 Einleitung

Semiochemikalien (*semeion*: griechisch für Signal, Hinweis) sind organische Moleküle, welche der chemischen Kommunikation zwischen Lebewesen dienen. Die semiochemische Kommunikation kann in eine interspezies spezifische (Individuen verschiedener Spezies) und intraspezies spezifische (Individuen gleicher Spezies) Kommunikation unterteilt werden (Law and Regnier, 1971). Im Jahr 1959 kreierten Karlson und Lüscher den Terminus „Pheromon“ für die Botenstoffe, die der Kommunikation innerhalb (*intra*) einer Spezies dienen. Der Begriff setzt sich aus den griechischen Worten *pherein* (übermitteln) und *hormon* (anregen) zusammen. Laut Definition von 1959 sind Pheromone „Substanzen, die durch ein Individuum nach außen sezerniert werden und von einem Individuum der gleichen Spezies wahrgenommen werden und in diesem eine spezifische Reaktion auslösen“ (Karlson and Luscher, 1959). Die spezifischen Reaktionen umfassen einerseits unmittelbare Verhaltensänderungen mit kurzer Latenz zwischen Detektion und Verhaltensinduktion. Zu den von „Releaser-Pheromonen“ unmittelbar ausgelösten Verhalten gehören beispielsweise das Flucht-, Angriffs- und Sexualverhalten. Als „Primer-Pheromone“ werden diejenigen bezeichnet, die nachhaltige physiologische Veränderungen neuroendokriner Systeme bewirken und so beispielsweise den Reproduktionsstatus und den Östrus-Zyklus von Weibchen modulieren können (Bossert and Wilson, 1963). Viele Pheromon-Effekte wurden nach ihrem Erstbeschreiber benannt. Einige dieser und weitere sind in Abbildung 5 mit ihrer Herkunft und der transduzierenden Sinneszellpopulation dargestellt. Die der interspezies spezifischen Kommunikation dienenden Allelochemikalien werden abhängig davon, wen sie durch ihre Wirkung bevorteilen, noch weiter unterteilt. Kairomone sind vorteilhaft für den Empfänger, Allomone für den Sender und Synomone nützen sowohl Empfänger als auch Sender (Wyatt, 2003).

<u>Verhalten</u>	<u>Pheromone</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Rezeptor</u>
Lee Boot Effekt (Östrus-Unterdrückung)	2,5-Dimethylpyrazin (DMP)	weiblicher Urin	V1R-VSNs
	$\alpha$ und $\beta$ Farnesene	Männliche Vorhautdrüse	V1R-VSNs
	n-Pentylacetat	Urin	V1R-VSNs
Whitten Effekt (Östrus-Induktion und Synchronisation)	2-Sec-butyl-4,5-dihydrothiazol (SBT)	männlicher Urin	V1R-VSNs
	2,3-Dehydro-exo-brevicomin (DHB)	männlicher Urin	V1R-VSNs
Vandenbergh Effekt (Pubertäts-Beschleunigung)	2-Sec-butyl-4,5-dihydrothiazol (SBT)	männlicher Urin	V1R-VSNs
	2,3-Dehydro-exo-brevicomin (DHB)	männlicher Urin	V1R-VSNs
	Isobutylamin	männlicher Urin	V1R-VSNs
	Isoamylamin	männlicher Urin	???
	MUPs	männlicher Urin	V2R-VSNs
Bruce Effekt (selektiver Abort)	MHC Peptide	Urin	V2R-VSNs
Ostrus-Verlängerung	2-Heptanon	Urin	V1R-VSNs (V1Rb2)
Lordosierung in Weibchen	ESP-1	männliche Tränendrüse	V2Rp5
Inhibition von männlichem Sexualverhalten	ESP-22	Tränendrüse	V2R-VSNs
Aggressionsverhalten	MUP-25	männlicher Urin	V2R-VSNs
	2-Sec-butyl-4,5-dihydrothiazol (SBT)	männlicher Urin	V1R-VSNs
	2,3-Dehydro-exo-brevicomin (DHB)	männlicher Urin	V1R-VSNs
Erkennung von Individualität	MHC Peptid	Urin	V2R-VSNs
	MUP	Urin	V2R-VSNs

**Abbildung 5:** Übersicht über einige Pheromon-Effekte mit ihren auslösenden Pheromonen, ihrer Herkunft und den transduzierenden Rezeptoren.

## 2.6.2 Volatile Urinduftstoffe (VUDs)

Urin von Mäusen beinhaltet viele verschiedene Komponenten, die als chemische Signale fungieren können. Neben den *major urinary proteins* (siehe auch 2.6.3) sind viele volatile organische Moleküle von besonderem Interesse, da diese selektiv bestimmte VSNs (aber auch OSNs) aktivieren können und vielfältige Verhaltensweisen regulieren.

Die Arbeitsgruppe von Novotny veröffentlichte viele Verhaltensexperimente mit verschiedenen volatilen Urin-Duftstoffen (VUDs). Sie zeigten, dass zwei dieser VUDs synergistisch wirken. DHB (Dehydro-exo-brevicomin) und SBT (2-sec-Butyl-4,5-Dihydrothiazol) stimulieren aggressives Verhalten in Männchen nur, wenn beide Komponenten simultan dem Urin von kastrierten Männchen hinzugefügt werden. Das Hinzufügen beider Komponenten in destilliertes Wasser zeigte keinen aggressions-induzierenden Effekt, sodass daher DHB und SBT nur dann wirksam scheinen, wenn diese



mit weiteren Duftstoffen des Urins detektiert werden (Novotny et al., 1985). Auch die Attraktivität eines Duftstoffes auf Weibchen wird nur bei simultaner Applikation von DHB und SBT signifikant verstärkt. Die simultane Applikation verlängerte außerdem die begattungsfähige Phase im Östrus-Zyklus (Jemiolo et al., 1985). Darüber hinaus sind DHB und SBT in der Lage den Whitten-Effekt, eine Synchronisation des weiblichen Zyklus via Östrus-Induktion, zu induzieren (Jemiolo et al., 1986a).

2,5-Dimethylpyrazin (DMP) wird vorzugsweise von Weibchen in den Urin ausgeschieden, wenn diese für einen längeren Zeitraum zusammen mit weiteren weiblichen Artgenossen gehalten werden. DMP verzögert sowohl bei Weibchen als auch bei Männchen die sexuelle Reifung, indem die Pubertät beziehungsweise das Wachstum von Hoden und geschlechtsspezifischen Drüsen unterdrückt wird (Jemiolo and Novotny, 1994). Für die DMP Ausscheidung sind die Nebennieren von entscheidender Bedeutung (Novotny et al., 1986). In ovariectomierten Mäusen zeigte sich keine Veränderung bezüglich der Verzögerung der sexuellen Reifung (Drickamer et al., 1978). In adrenalectomierten Mäusen hingegen war die Konzentration von einigen VUDs wie beispielsweise DMP und 2-Heptanon erheblich reduziert. Urin dieser Mäuse war nur nach Anhebung der Konzentrationen auf die physiologischen Spiegel in der Lage, seine biologische Aktivität wieder zuerlangen (Novotny et al., 1986).

Die meisten VUDs sind sowohl im Urin als auch im Körpergeruch der Mäuse vorhanden, wobei einige Moleküle spezifisch für Urin oder Körpergeruch zu sein scheinen (Röck et al., 2006). Leinders-Zufall et al. (2000) etablierten die zelluläre Grundlage der Pheromonwahrnehmung des VNO. Verschiedene VUDs im nanomolaren, teils picomolaren Konzentrationsbereich lösten Potentialänderungen (Elektrovomeronasogramme) und intrazelluläre Kalziumkonzentrationsanstiege in VSNs aus. Damit wurde gezeigt, dass vomeronasale Sinneszellen ultrasensitive Detektoren bestimmter Pheromone darstellen (Leinders-Zufall et al., 2000).

## *2-Heptanon*

Die Konzentration von 2-Heptanon im Urin von adrenektomierten Weibchen ist drastisch reduziert. Hohe Konzentrationen von bestimmten volatilen Ketonen, unter anderem 2-Heptanon, sind jedoch essentiell für die Beschleunigung der Pubertät und Verlängerung des Östrus in jungen Weibchen. Trächtige und laktierende Weibchen sezernieren unter anderem 120-230% mehr 2-Heptanon. Diese Konzentrationsspiegel sind nötig, um die pubertäts-verzögernde Wirkung anderer VUDs außer Kraft zu setzen. Dieser Aspekt reflektiert, dass das quantitative Verhältnis der sezernierten VUDs die physiologischen Pheromon-Wirkungen bestimmt (Jemiolo et al., 1989). Neben den genannten Funktionen scheint 2-Heptanon in Mäusen – ähnlich wie bei den Bienen (Shearer and Boch, 1965) – eine Art Alarmfunktion auszulösen. Emotionaler Stress durch Angst und Verzweiflung führte zu erhöhten 2-Heptanon-Konzentrationen im Urin (Gutiérrez-García et al., 2006, 2007). Boschat et al. konnten 2002 durch eine Mauslinie mit einer tau-GFP-abhängigen Deletion des V1rb2-Rezeptor diesen als einen spezifischen 2-Heptanon-Rezeptor definieren. Sie beobachteten aber auch, dass andere VSNs 2-Heptanon detektieren können (Boschat et al., 2002). Eine Knockoutmauslinie mit Deletion des V1ra- und V1rb-Genclusters (und damit auch V1Rb2-Rezeptor-Deletion) war nicht mehr in der Lage Isobutylamin, jedoch 2-Heptanon zu detektieren (Del Punta et al., 2002). 2-Heptanon aktiviert jedoch nicht nur mehrere V1R-Subpopulationen, sondern ist auch in der Lage, olfaktorische Neurone des MOE zu stimulieren (Spehr et al., 2006). Das Keton 2-Heptanon stellt damit einen potenten Stimulus des VNO und MOE dar (Wang, 2006).

### **2.6.3 Major Urinary Proteins (MUPs)**

Major urinary proteins (MUPs) gehören zur Familie der Lipocalin-Proteine. Die MUPs werden androgen-abhängig in der Leber synthetisiert und über die Niere in den Urin ausgeschieden (Finlayson et al., 1965). Mäuse exprimieren ein definiertes Muster von vier bis sechs MUPs (Beynon and Hurst, 2003). Ungefähr 21 verschiedene MUP-Gene können exprimiert werden.

Ein Großteil dieser Gene besitzt eine Sequenzhomologie von größer 97% (Logan et al., 2008). MUPs zeichnen sich molekulargenetisch durch eine beta-Faltblatt-Struktur mit hydrophober Bindungstasche im Inneren aus. Diese Bindungstasche trägt typischerweise kleine organische Liganden wie beispielsweise SBT (2-s-butyl-4,5-dihydrothiazole) (Böcskei et al., 1992). Chamero et al. (2007) untersuchten die Funktion der MUPs selbst, indem sie den hydrophoben Liganden der Bindungstasche vom MUP-Komplex trennten. Im Resident-Intruder-Verhaltenstest (siehe auch 2.7.2 Aggressionsverhalten) lösten die aufgereinigten MUPs aggressives Verhalten aus, und Kalzium-Imaging Experimente zeigten, dass MUPs in V2R-Gα<sub>o</sub> exprimierenden VSNs einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration auslösen. Damit konnten MUPs erstmals als eigenständige Pheromone identifiziert werden, die VNO-abhängig aggressives Verhalten hervorrufen (Chamero et al., 2007). Bereits Mucignat-Caretta et al. (1995) beschrieben den Funktionserhalt von purifiziertem MUP in Verhaltensexperimenten. Neben männlichem Urin beschleunigte auch purifiziertes MUP die Pubertät. Für die im Inneren gebundenen organischen Moleküle konnten sie diesen Effekt hingegen nicht nachweisen (Mucignat-Caretta et al., 1995).

MUPs dienen ähnlich wie MHC-Peptide auch der Erkennung von Individualität. Man nimmt an, dass sowohl das MUP- als auch das MHC-Peptid-Spektrum im Urin für diese Unterscheidung eine wichtige Rolle spielen (Hurst et al., 2001).

Neben der Pheromon-Funktion wurde vor kurzem auch eine Funktion der MUPs als Kairomon beschrieben (Papes et al., 2010). Kairomone sind chemische Moleküle, die der *interspezies* spezifischen Kommunikation dienen. Sie begünstigen *per definitionem* den Empfänger und benachteiligen den Sender (Tirindelli et al., 2009; Wyatt, 2003). Papes et al. (2010) isolierten das MUP-Homolog „Feld4“ aus dem Speichel von Katzen. Feld4 konnte vomeronasale, nicht jedoch olfaktorische Sinneszellen in Mäusen aktivieren. Wildtypmäuse zeigten im Gegensatz zu *funktionell* VNO-defizienten TRPC2<sup>-/-</sup>-Mäusen ein signifikantes Vermeidungsverhalten gegenüber Feld4, sodass Feld4 als potenter Stimulator eines VNO-abhängigen Vermeidungsverhaltens identifiziert werden konnte (Papes et al., 2010).

Roberts und Kollegen benannten ein spezifisches MUP in Anlehnung an Jane Austens

Protagonist Mr. Darcy im Roman *Pride and Prejudice* als „Darcin“. Darcin selbst ist in der wissenschaftlichen Literatur redundant bereits als „18893Da MUP“, „MUP17“, „MUP24“ beziehungsweise „MUP20“ klassifiziert worden. Roberts et al. (2010) beobachteten, dass Darcin alleine die gleiche sexuelle Anziehungskraft auf Weibchen bewirkte wie vollständiger, intakter männlicher Urin. Darüber hinaus stimulierte Darcin einen assoziativen Lerneffekt. Andere von Männchen abgesonderte volatile Duftstoffe wirkten sexuell anziehend auf Weibchen, wenn diese die volatilen Duftstoffe zuvor mit Darcin zusammen wahrgenommen hatten (Roberts et al., 2010). In einer Folgestudie zeigten Roberts et al. (2012), dass Darcin auch in der Lage ist, Präferenzen für ein bestimmtes räumliches Umfeld zu konditionieren. Sowohl Weibchen als auch potentiell rivalisierende Männchen verbrachten signifikant mehr Zeit an einer mit Darcin markierten Stelle in einer Testarena als an anderen Stellen. Dieses Verhalten zeigten die Mäuse auch weiterhin, selbst wenn die zuvor markierte Stelle nicht mehr mit Darcin markiert war (Roberts et al., 2012).

## 2.6.4 Major Histocompatibility Complex Peptide (MHC-Peptide)

MHC-Klasse-I-Peptide haben klassischerweise eine Länge von acht bis zehn Aminosäuren. Von besonderer Bedeutung sind die Positionen der Aminosäuren. Sie reflektieren den MHC-Gen-Polymorphismus und beeinflussen die Bindungseigenschaften der Peptide (Rammensee, 1995). MHC-Peptide dienen dem Immunsystem zur Differenzierung von eigen und fremd. Sie werden an der Zelloberfläche exprimiert und vom T-Zell-Rezeptor der  $CD_8^+$ -zytotoxischen T-Zellen registriert. Wird eine Zelle als fremd erkannt, so wird die Apoptose induziert (Davis et al., 2007). Bereits in den 1980ern wurde beobachtet, dass das Paarungsverhalten von Mäusen maßgeblich davon abhängig war, welches MHC-Genom sie exprimierten. Paarungspräferenzen bestanden zwischen denjenigen Mäusen, bei denen sich der H2-Chromosomenabschnitt des Partners (MHC entspricht H2 in Mäusen und HLA in Menschen) vom eigenen grundlegend unterschied (Yamazaki et al., 1976). Die Resultate von Singh et al. (1987) konnten diese Annahme stützen. Sie wiesen nach, dass die

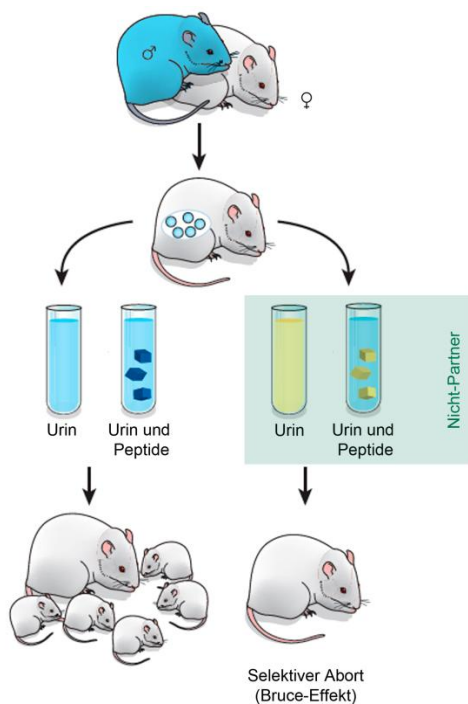
MHC-Moleküle – also Zelloberflächen Glykoproteine – auch in den Urin sezerniert werden, und dass untrainierte Ratten Urinproben unterschiedlicher Donoren anhand dieser Moleküle differenzieren können (Singh et al., 1987).

Leinders-Zufall et al. (2004) entschlüsselten V2R/Gα<sub>o</sub>-VSNs als MHC-Peptid-detektierende Neurone. Darüber hinaus dienten die MHC-Peptide in Verhaltensexperimenten der Erkennung von Partnern, da diese den Bruce-Effekt vermitteln können (siehe Abbildung 6 und 2.7.4) (Leinders-Zufall, 2004).

Das Signaltransduktionsmolekül TRPC2 ist jedoch nicht essentiell für die Detektion der MHC-Peptide, da in elektrophysiologischen Experimenten TRPC2-defizienter Mäuse die MHC-Peptide noch immer VSNs aktivieren können. Übereinstimmend damit ist auch der – *vermutlich MHC-Peptid-abhängige* – Bruce-Effekt in dieser Mauslinie nicht beeinflusst (Kelliher et al., 2006). Der Bruce-Effekt kann jedoch nicht nur durch nativen Urin von adulten Männchen, sondern auch durch Urin von kastrierten und juvenilen Männchen ausgelöst werden, sodass eine Androgen-abhängige Produktion der Bruce-Effekt induzierenden Moleküle/MHC-Peptide unwahrscheinlich ist (Thompson et al., 2007). Nicht auszuschließen sind jedoch auch andere Stoffe im Urin, die der Maus eine Unterscheidung von fremd und nicht-fremd ermöglicht (Sturm et al., 2013). Die strukturellen Anforderungen für die Aktivierung der VSNs durch MHC-Peptide sind teilweise bekannt. V2R-VSNs im VNO antworten auf MHC-Peptide. Zu diesen gehören sowohl H2Mv positive als auch H2Mv-negative V2R-Neurone. Verschiedene MHC-Peptide können von einem definierten VSN erkannt werden. Der Austausch einer Aminosäure im MHC-Nonamer veränderte bereits die Bindungsaffinität, sodass die V2R-Neurone hochspezifisch MHC-Peptide differenzieren können. Dass H2Mv-Moleküle als Rezeptor für MHC-Peptide fungieren, konnte durch diese Studie weitestgehend ausgeschlossen werden: V2R1b-VSNs exprimieren kein H2Mv, detektieren jedoch hochspezifisch MHC-Peptide (Leinders-Zufall et al., 2009).

Mäuse, denen das VNO chirurgisch entfernt wurde, interessieren sich immer noch signifikant stärker für Urin mit MHC-Peptiden einer anderen Mauslinie. Im MOE können MHC-Peptide negative Feldpotentiale im Elektroolfaktogramm auslösen, sodass ausgehend von diesen

Resultaten eine essentielle Rolle des MOS bei der Detektion von MHC-Peptiden angenommen wird (Spehr, 2006). Ohne VNO jedoch können MHC-Peptide nicht den Bruce-Effekt auslösen, sodass die Detektion der MHC-Peptide in zwei unterschiedlichen Geruchssystemen auch unterschiedliche Funktionen vermuten lassen (Kelliher et al., 2006).



**Abbildung 6** Der Bruce-Effekt. Urin und MHC-Peptide des Partnermännchens in blau. Sowohl die Detektion von intaktem Urin eines fremden Männchens (gelb) als auch der Zusatz von MHC-Peptiden aus dem Urin fremder Männchen (gelb) in den Urin des Partnermännchens (blau) erhöhen drastisch die Wahrscheinlichkeit eines induzierten Schwangerschaftsabbruches (selektiver Abort). *Modifiziert nach Brennan und Zufall (2006).*

### 2.6.5 Exocrine gland secreting Peptid (ESP)

Die von exokrinen Drüsen sezernierten Peptide (exocrine gland secreting peptides, ESPs) sind eine Gruppe von Peptiden, die Bestandteil von Tränenflüssigkeit und Speichel bei Mäusen sind. Man nimmt an, dass 24 der 38 Mitglieder der ESP-Gen-Familie für ein funktionierendes Transkript kodieren. Die anderen 14 Genabschnitte sind Pseudogene (Kimoto et al., 2007). Für einige ESPs konnten bereits spezifische Funktionen entschlüsselt werden. ESP1 wurde als erster Vertreter dieser Gruppe identifiziert. Es wird aus der extraorbitalen Tränendrüse von männlichen Mäusen in die Tränenflüssigkeit sezerniert und wird durch physischen Kontakt vom VNO eines Weibchens detektiert (Kimoto et al., 2005). Im VNO erkennt der V2Rp5-Rezeptor das ESP1 und verstärkt über direkte respektive

indirekte Verschaltungen zur Amygdala und hypothalamischen Kernen das weibliche Sexualverhalten, indem das Weibchen durch Lordosierung die Kopulation vereinfacht (Haga et al., 2010).

ESP36 wird spezifisch von Weibchen der Wildtyplinie BALB/c exprimiert. In der Pubertät (Alter < 4 Wochen) exprimieren sowohl Männchen als auch Weibchen ESP36, jedoch nicht ESP1. Ab der 4. - 5. Woche wird in Männchen die ESP1-Expression Testosteron-abhängig herauf und die ESP36-Expression herunter reguliert (Kimoto et al., 2007).

ESP22 wird von juvenilen Mäusen während der Pubertät in 50-fach höherer Konzentration in die Tränenflüssigkeit sezerniert als von erwachsenen Mäusen. Während der 2. und 3. Lebenswoche ist die Expression maximal und nimmt ab der 4. Woche drastisch ab. Verlust der ESP22-Produktion stimuliert männliches Sexualverhalten gegenüber jüngerer Mäuse. Auch TRPC2-defiziente Mäuse (funktionell defekte VNO-Signaltransduktion) zeigen ein erhöhtes Sexualverhalten gegenüber jüngeren Artgenossen. Das Verhalten in der global geknockten TRPC2<sup>-/-</sup> könnte jedoch auch neomorph bedingt sein und ist daher bedingt interpretierbar. In Zusammenschau mit den Experimenten von Ferrero et al. (2013) besteht die Annahme, dass ESP22 als effektiver Suppressor von männlichem Paarungsverhalten gegenüber juvenilen Artgenossen fungiert (Ferrero et al., 2013).

### **2.6.6 Formylierte Peptide und hFPR-aktivierende Peptide**

N-formylierte Peptide sind klassische Chemokine des Immunsystems und vermitteln Chemotaxis von Leukozyten via Formyl-Peptid-Rezeptor Aktivierung. N-formylierte Peptide kommen als Protein-Spaltprodukte aus Bakterien und Mitochondrien vor, denn beide Funktionseinheiten initiieren ihre Proteinbiosynthese mit einem n-formyl-Methionin Element. Das formylierte Tripeptid f-MLF (n-formyliertes-Methionin-Leucin-Phenylalanin) aus *Escherichia coli* ist als erster Agonist von FPRs beschrieben worden. Mit unterschiedlicher Affinität aktiviert er alle drei humanen FPRs (Le et al., 2002; Migeotte et al., 2006). Riviere et al. (2009) konnten in mFpr-rs3, -rs4, -rs-6 und -rs-7 exprimierenden HEK293-Zellen mit

f-MLF intrazelluläre Kalziumkonzentrationsanstiege detektieren. Auch in einem *en face ex vivo* Experiment konnte mittels konfokalem Kalziumimaging eine Aktivierung von VSNs durch f-MLF registriert werden (Rivière et al., 2009). Bufe et al. (2012) hingegen konnten in ihrem *in vitro* Assay weder das f-MLF noch andere von Riviere et al. (2009) getestete Liganden als Agonisten für mFpr-rs bestätigen. F-MLF aktivierte jedoch sowohl die humanen als auch die murinen FPRs hFPR1, hFPR2, hFPR3, mFpr1 und mFpr2 (Bufe et al., 2012).

Das mitochondriale Genom der Maus kodiert für 13 Proteine der Atmungskette (Bibb et al., 1981). Gene spezifischer NADH-Dehydrogenase-Untereinheiten (ND) und der Cytochrom-C-Oxidase I (COI) kodieren für Peptid-Derivate, die mit hoher Affinität von hFPR1 und geringerer Affinität auch von hFPR2 erkannt werden können. Die Aminosäuresequenzen dieser Peptide beginnen einheitlich mit einem n-formylierten Methionin (Rabiet et al., 2005). Interessanterweise binden n-formylierte Peptide von ND1-6I (f-MFFINILTL) und f-COI-3I (f-MFINRWLFS) ebenfalls mit sehr hoher Affinität an das nicht klassische MHC-Molekül der Klasse Ib „H2-M3“. Über H2-M3 werden diese mitochondrialen Peptide zytotoxischen T-Lymphozyten präsentiert und dienen der positiven und negativen Selektion im Thymus und der CD<sub>8</sub><sup>+</sup>-T-Zell-Aktivierung (siehe auch 2.3.7). Damit stellen einige formylierte Peptide sowohl Kandidaten für nicht klassische MHC-Moleküle als auch für Formyl-Peptid-Rezeptoren dar (Byers and Lindahl, 1999; Chiu et al., 1999; Dabhi et al., 1998; Morse et al., 1996).

Das synthetische Hexapeptid „W-Peptid“ (WKYMVM) ist ein Agonist aller drei hFPRs und der mFprs und ist besonders biologisch aktiv, wenn an Stelle 6 des Peptids das L-Methionin durch ein D-Methionin ersetzt wird (WKYMVm) (Bufe et al., 2012; Christophe, 2001). Bufe et al. (2012) identifizierten einige W-Peptid Derivate als Agonisten für den mFpr-rs1 und konnten strukturelle Anforderung für die Liganden-Rezeptorbindung charakterisieren (Bufe et al., 2012).



### 2.6.7 Steroidderivate

Sulfatierte Steroide aus dem Urin sind in der Lage VSNs zu aktivieren. Die Behandlung von nativem Urin mit einer Sulfatase führt zu einem drastischen Verlust der auslösbaren Aktivität, sodass die Sulfat-Gruppe als eine entscheidende Komponente bei der Ligandenaktivierung bestimmter Steroide angenommen wird (Nodari et al., 2008). Stress führt in Mäusen zur Ausscheidung einer erhöhten Konzentration sulfatierter Glucocorticoide. Damit geben Individuen ihren physiologischen und metabolischen Status preis (Hsu et al., 2008). Isogai et al. (2011) zeigten, dass verschiedene V1R-VSNs unterschiedliche Steroid-Derivate detektieren und so nicht nur Glucocorticoide, sondern auch Androgene und Östrogene differenzieren. Mäuse können damit eine weitere Facette ihres physiologischen Status offenbaren (Isogai et al., 2011).

## 2.7 Pheromon-induzierte Effekte

### 2.7.1 Östrus-Modulation und Modulation der reproduktiven Phase

Isolierte Weibchen sind nach ungefähr 5 bis 6 Wochen geschlechtsreif und machen regelmäßig Sexualzyklen (den sogenannten Östrus-Zyklus) durch. Die vier Phasen Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus werden normalerweise innerhalb von 4 bis 5 Tagen durchlaufen, wobei der Östrus die begattungsbereite Phase darstellt und ungefähr 24 Stunden dauert (Caligioni, 2009). Im Jahr 1956 entdeckte Whitten als erster ein spezifisches Verhalten in Mäusen, das durch einen externen Stimulus ausgelöst wird, und veröffentlichte damit *per definitionem* (nach Karlsson und Lüscher 1959) den ersten wissenschaftlich verfassten Pheromon-Effekt. Seither als Whitten-Effekt bekannt, beobachtete Wesley K. Whitten, dass Urinbestandteile den Östrus-Zyklus von gemeinsam gehaltenen Weibchen synchronisieren (Whitten, 1956). Einige Bestandteile des weiblichen Urins werden Nebennieren-abhängig in den Urin sezerniert und unterdrücken in Anwesenheit anderer Weibchen deren Östrus (Novotny et al., 1986). Die männlichen VUDs SBT und DHB sind in der Lage diese Östrus-Suppression zu überwinden, die Östrus-Induktion zu stimulieren und damit den Whitten-Effekt auszulösen (Jemiolo et al., 1986b). Der Vandenbergh-Effekt (nach John G. Vandenbergh 1969) beschreibt die Akzeleration des weiblichen Pubertätsbeginnes durch männliche Duftstoffe, sodass eine Geschlechtsreife bereits 4 Wochen nach Geburt bestehen kann (Vandenbergh, 1969).

### 2.7.2 Aggressionsverhalten

Aggressives Verhalten kann bei Mäusen beispielsweise anhand der Anzahl der Angriffe (Beißen, Treten und Schlagen), der kumulativen Angriffszeit und der Latenz zum ersten Angriff quantifiziert werden. Zur Objektivierung wird häufig der Resident-Intruder-Assay (RIA) angewandt. Bei diesem wird eine Maus in einem „Heimat-Käfig“ für 48 Stunden isoliert. Anschließend wird ein kastriertes Männchen in den Käfig gesetzt. Für 10 Minuten werden

oben genannte Aggressions-Parameter gemessen und anschließend die Maus wieder entfernt. Der erste Durchgang dient der Quantifizierung der Basis-Aggression. Das kastrierte Männchen wird dann entweder mit dem zu testenden Stimulus oder einer Kontroll-Lösung an mehreren Stellen bedeckt und erneut in den Käfig gesetzt. Simultane Behandlung von kastrierten Männchen mit SBT und DHB oder mit bestimmten MUPs führten zu einem ausgeprägten Aggressionsverhalten wie es Männchen physiologischer Weise gegenüber nicht kastrierten Männchen aufbringen (Chamero et al., 2007; Novotny et al., 1985). Unterbrechung der Signaltransduktionskaskaden sowohl im VNO aber auch im MOE führen zu signifikant reduziertem bis ausbleibendem Aggressionsverhalten. Dieses gilt beispielsweise für  $CNGA2^{-/-}$  und  $AC3^{-/-}$  im MOE (Mandiyani et al., 2005; Wang, 2006), und für  $TRPC2^{-/-}$ ,  $SIRK^{-/-}$  und  $GIRK^{-/-}$  im VNO (Kim et al., 2012; Leybold et al., 2002; Stowers et al., 2002).

Ähnlich dem männlichen Aggressionsverhalten gegenüber einem männlichen Eindringling zeigen auch laktierende Weibchen ein aggressives Verhalten gegenüber männlichen Eindringlingen im Resident-Intruder-Assay (maternales Aggressionsverhalten) (Gandelman, 1972). Auch hier ist die Intaktheit des olfaktorischen Systems essentiell für physiologische maternale Aggression. Chirurgische oder funktionelle Defekte führen zu drastisch reduziertem Angriffsverhalten laktierender Weibchen (Bean and Wysocki, 1989; Leybold et al., 2002). Da sowohl ein defektes MOE als auch VNO den Aggressionsphänotyp beeinflussen können, wird bei Experimenten zur Untersuchung maternalen Aggression die Intaktheit des maternalen MOS durch den *pup retrieval test* mitüberprüft. Ist das MOS intakt, so sind Weibchen in der Lage, Ihre Jungtiere nach willkürlichem Umsetzen im Käfig wiederzufinden (Wysocki and Lepri, 1991).

### 2.7.3 Sexualverhalten

Weibchen reagieren auf sexuelle Stimulation mit einer charakteristischen Lordosierung der Wirbelsäule. Diese Lordosierung erleichtert die Kopulation. Das aus der Tränendrüse von

Männchen sezernierte ESP1 ist in der Lage über Bindung an den V2Rp5-Rezeptor im weiblichen VNO, dieses Lordose-Verhalten zu stimulieren. In V2Rp5-defizienten Mäusen war das Verhalten trotz ESP1-Stimulation stark reduziert, aber immer noch vorhanden (Haga et al., 2010).

Urinbestandteile wie MUPs und VUDs spielen ebenfalls eine wichtige Rolle beim Sexualverhalten: Weibchen präferieren nicht nur Darcin-haltigen Urin, sondern Darcin-Detektion führt auch zu einem assoziierten Lerneffekt von volatilen Duftstoffen. Weibchen präferieren diese mit Darcin-konditionierten Volatila gegenüber anderen Duftstoffen (Roberts et al., 2010). Manche volatilen Urin-Duftstoffe (siehe auch VUDs) wurden als besonders anziehend identifiziert. Zwei Komponenten aus der Vorhautdrüse des Männchens ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Farnesene) werden in Stimulus-Präferenz-Tests besonders aktiv von Weibchen untersucht (Jemiolo et al., 1991). Die Vorhautdrüse sezerniert auch (Z)-5-tetradecen-1-ol in den Urin. Olfr288 aus dem MOE wurde als Rezeptor für den Testosteron-abhängig sezernierten Liganden identifiziert. In Verhaltensexperimenten zeigt sich, dass der Ligand besonders attraktiv auf Weibchen wirkt (Yoshikawa et al., 2013).

Defekte in der Signalübertragung ( $CNGA2^{-/-}$ ,  $AC3^{-/-}$ ) im hauptolfaktorischen System führten in einigen Studien dazu, dass Mäuse kein Paarungsverhalten mehr zeigten. Daher ist nicht nur die Intaktheit des AOS, sondern auch die des MOS bedeutend für das Reproduktionsverhalten (Mandiyan et al., 2005; Wang, 2006).

Bei TRPC2-defizienten Männchen mit einer funktionellen VNO-Blockade hingegen war das Paarungsverhalten nicht reduziert. Jedoch schienen die Knockout-Mäuse nicht in der Lage zu sein, die Geschlechter ihrer Artgenossen zu differenzieren. Sowohl Weibchen als auch Männchen wurden regelmäßig bestiegen (Leypold et al., 2002; Stowers et al., 2002). Pankevich et al. (2004) vermuteten, dass das VNO nicht der Geschlechter-Diskrimination dient, sondern vielmehr, dass das VNO in der Lage ist, Urin-Komponenten des entgegengesetzten Geschlechtes zu identifizieren, und dass diese Duftstoffe eine Bindung von Männchen und Weibchen stützen. Diese Grundlage fehlt bei TRPC2-Defizienz (Pankevich, 2004). Festzuhalten ist jedoch, dass die  $TRPC2^{-/-}$  eine globale

Knockoutmauslinie darstellt. TRPC2-Deletion im Bereich des AOS oder beispielsweise des limbischen Systems könnte sowohl Verhaltensaktivitäten beeinflussen als auch neomorphes Verhalten induzieren (Hasen and Gammie, 2009). SK3<sup>-/-</sup>- und GIRK1<sup>-/-</sup>-defiziente Männchen besitzen ein reduziertes Sexualverhalten gegenüber Weibchen. Ein TRPC2-SK3-Doppel-Knockout zeigte ein reduziertes Männchen-Weibchen-Sexualverhalten. Gegenüber Männchen zeigte sich jedoch wie beim Einzel-TRPC2-Knockout wieder eine signifikant gesteigertes Sexualverhalten, sodass dieses gleichgeschlechtliche Paaren TRPC2-Knockout-spezifisch sein könnte (Kim et al., 2012).

#### 2.7.4 Erkennen von Individualität

Über den Geruchssinn sind Mäuse in der Lage, Artgenossen zu unterscheiden. Sie erkennen Eltern und Nachkommen, sodass Inzucht-Paarung verhindert werden kann. Der nach Hilda M. Bruce benannte Bruce-Effekt (1959) beschreibt den selektiven Abort beziehungsweise die Verhinderung der Nidation der befruchteten Eizelle, wenn innerhalb von 24 Stunden nach der Kopulation das Weibchen in Kontakt mit einem fremden Männchen respektive dessen Urin kommt (Bruce, 1959). Die Norepinephrin-Ausschüttung während der Paarung bildet in Weibchen ein mehrere Wochen anhaltendes Gedächtnis. Auf diese Weise kann das Weibchen Partner-Männchen und Fremd-Männchen unterscheiden (Brennan et al., 1990). Der selektive Abort liegt einem drastischen Abfall der Prolaktin-Ausschüttung aus der Hypophyse zu Grunde, sobald der fremde Duftstoff registriert wird. Die Schwangerschaft kann nicht mehr aufrechterhalten werden (Keverne, 1983). Leinders-Zufall et al. (2004) zeigten, dass MHC-Peptide den Bruce-Effekt vermitteln können (Leinders-Zufall, 2004). Diese Peptide können sowohl vom VNO als auch vom MOE detektiert werden (Spehr et al., 2006). Das VNO ist jedoch – im Gegensatz zum MOE – essentiell an der Vermittlung dieses Effektes beteiligt, wobei die genaueren molekularen Mechanismen noch unbekannt sind (Brennan and Zufall, 2006). Während eine funktionelle VNO-Blockade durch TRPC2-Defizienz den Bruce-Effekt nicht beeinflusst, zeigt sich bei chirurgischen Läsionen im VNO

der Bruce-Effekt drastisch gestört. In diesem Zusammenhang zeigten Kelliher et al. (2006) auch, dass MHC-Peptide von TRPC2-defizienten VSNs detektiert werden können. Dieses kann erklären, warum trotz TRPC2-Defekt der Bruce-Effekt ungestört bleibt (Kelliher et al., 2006).

Bereits 2001 betonten Hurst et al., dass nicht nur MHC-Peptide, sondern auch MUPs einem ausgesprochen hohen genetischen Polymorphismus unterliegen. Sie zeigten, dass MUPs eine wichtige Rolle bei der Erkennung von männlichen Geschwistern spielen. Urin eines Bruders mit einem MUP-Typ, der sich vom eigenen unterscheidet, wird signifikant aktiver untersucht (Hurst et al., 2001). In weiteren Publikationen von Hurst et al. (2007) werden MUPs als wichtiges Erkennungssignal in den Vordergrund gestellt. Die Arbeitsgruppe bestätigte jedoch, dass vielfältige MHC-Peptide diskriminiert werden können (Cheetham et al., 2007). Sie zeigten, dass Mäuse in einer seminaturalen Umgebung (250m<sup>2</sup> großes Gehege) nicht Partner mit dem gleichen MHC-Haplotyp meiden, sondern Artgenossen mit dem gleichen MUP-Haplotyp. Sie schlussfolgerten daraus, dass MUPs die genetische Basis für die Verhinderung von Inzucht darstellen (Sherborne et al., 2007).

Die Unterscheidung von Freund und Feind beziehungsweise die Identifikation von potentiellen Gefahren ist von immenser Bedeutung für das Überleben einer Spezies. Beutetiere haben viele Mechanismen entwickelt, um sich vor Raubtieren zu schützen. Der Geruchssinn ermöglicht Beutetieren die Wahrnehmung von Raubtier-Duftstoffen, die diese aus Speichel, Fell, Urin, Fäkalien und Analdrüsen an die Umwelt abgeben. Auf die Detektion reagieren Mäuse mit prototypischen Verhaltensänderungen wie reduzierter Lokomotorik, Flucht in geschützte respektive duftfreie Zonen und Reduktion von Reproduktions- und sonstigen Verhalten, welche nicht der Verteidigung dienen. Es kommt zu hormonellen Veränderungen mit reduzierten Testosteron- und erhöhten ACTH- und Cortisol-Plasmaspiegeln (Apfelbach et al., 2005).

Trimethylthiazon ist eines der Hauptbestandteile aus dem Sekret der Analdrüse des Rotfuchses (*Vulpes vulpes*) und wird vom MOE wahrgenommen. Es bewirkt Erstarrung während der Geruchswahrnehmung und führt anschließend zur Bevorzugung von dunklen

gegenüber beleuchteten Bereichen einer Testarena (Hebb et al., 2002). Das MUP-Homolog Feld4, das aus dem Speichel von Katzen isoliert werden konnte, wird über das VNO der Maus wahrgenommen. Es bewirkt defensives, duftvermeidendes Verhalten und einen drastischen ACTH-Plasmaspiegel-Anstieg als Zeichen des induzierten Stresses. Da die Maus als Empfänger von der Wahrnehmung profitiert und potentiellen Raubtieren entweichen kann, erfüllt Feld4 die klassischen Kriterien eines Kairomons (Papes et al., 2010).

## 2.8 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass die vomeronasalen Sinneszellen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren exprimieren. Die G-Proteine  $G\alpha_{i2}$  und  $G\alpha_o$  sind die quantitativ häufigsten G-Protein-Untergruppen im vomeronasalen Sinnesepithel und werden von der apikalen respektive basalen Sinneszellschicht exprimiert. Bisher konnte jedoch nicht experimentell untersucht werden, welche Rolle diese G-Protein-Expression für die jeweiligen Sinneszellpopulationen darstellt. Erstes Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der konditionellen, gewebsspezifischen  $G\alpha_o$ -Knockoutmauslinie die Funktion des G-Proteins  $G\alpha_o$  in der Signaltransduktion zu bestimmen.

Im Jahr 2003 wurde die Expression von nicht klassischen MHC-Molekülen der Klasse Ib im Vomeronasalorgan entdeckt. Die sogenannten H2Mv-Moleküle werden von einer Subpopulation der V2-Rezeptor-Sinneszellen exprimiert. Die Funktion der H2Mv-Expression ist seither jedoch unbekannt. Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Funktion von H2Mv in der Signaltransduktion. Dazu stand eine H2Mv-Knockoutmauslinie zur Verfügung.

Neben der V1- und V2-Rezeptor-Sinneszellpopulation konnte im Jahr 2009 eine weitere Rezeptorpopulation im Vomeronasalorgan entschlüsselt werden. Diese exprimieren Formyl-Peptid-Rezeptoren. Prototypische Liganden der Formyl-Peptid-Rezeptoren stellen formylierte und synthetische Peptide dar. Die Funktion und das Ligandenspektrum der Formyl-Peptid-Rezeptoren im Vomeronasalorgan sind noch unbekannt. Das dritte Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob vomeronasale Sinneszellen formylierte und synthetische Peptide detektieren können.

In dieser Arbeit wurden sowohl ein volatiles Amin als auch mehrere formylierte beziehungsweise synthetische Peptide als neue Liganden der vomeronasalen Sinneszellen identifiziert. Es entstand die Fragestellung, welche Sinneszellpopulation an der Erkennung dieser Liganden beteiligt ist. Das vierte Ziel dieser Arbeit war es daher, diese neu-identifizierten Liganden mit Hilfe der  $G\alpha_o$ - und H2Mv-Knockoutmauslinie ihren transduzierenden Sinneszellsubpopulationen zuzuordnen.





## 3 Material und Methoden

### 3.1 Einleitung

Zur Untersuchung der Funktion des G-Proteins  $G\alpha_o$  und der Funktion von H2Mv in vomeronasalen Sinneszellen wurden Elektro-Vomeronaso-Gramme (EVGs) erstellt. Diese elektrophysiologische Messmethode ähnelt anderen Elektrogrammen wie dem Elektro-Kardio-Gramm (EKG) des Herzens oder dem Elektro-Enzephalo-Gramm (EEG) des Gehirns. Beim EVG werden von der Oberfläche des vomeronasalen Sinnesepithels Potentialänderungen abgeleitet, die durch lokale Stimulusapplikation induziert werden. Mithilfe dieser Feldpotential-Messungen kann bestimmt werden, ob Stimuli in den vomeronasalen Sinneszellen eine elektrische Aktivierung auslösen. Diese Methode ermöglicht die Charakterisierung des elektrophysiologischen Phänotyps einer Mauslinie. Bei Verwendung von Mauslinien mit definierten genetischen Deletionen von Signaltransduktionselementen können durch die Aktivierungsmuster Rückschlüsse auf die Funktion dieser ausgelöschten Elemente gezogen werden.

### 3.2 Historie des Elektrovomeronasogramms

Das Elektrovomeronasogramm (EVG) entwickelte sich Ende der 1970er Jahre aus dem eng verwandten Elektroolfaktogramm (EOG). Hosoya et al. veröffentlichten im Jahr 1937 in ihrer Originalarbeit „Über die bioelektrischen Erscheinungen der Riechschleimhaut“, dass Potentialänderungen an der Riechschleimhaut des hauptolfaktorischen Epithels registriert werden können (Hosoya and Yoshida, 1937). Sowohl Lord E.D. Adrian in England als auch D. Ottoson in Schweden publizierten einige Jahre später wichtige Vorarbeiten des Elektroolfaktogramms (Adrian, 1950; Ottoson, 1954). Beide zeigten, dass die Stimulation der Riechschleimhaut auch zu Potentialdifferenzen im olfaktorischen Bulbus führt. 1955

publizierte E.D. Adrian das Elektroolfaktogramm der Riechschleimhaut eines Kaninchens. Er zeigte, dass die durch olfaktorische Stimuli ausgelösten Potentialänderungen im olfaktorischen Bulbus und der Riechschleimhaut ähnliche Charakteristika aufweisen und miteinander korrelieren (Adrian, 1955). In seiner Dissertation „Analyse der elektrischen Aktivität des olfaktorischen Epithels“ beschrieb D. Ottoson im Jahr 1955 ausführlich die Charakteristika von Elektroolfaktogrammen. Diese sind auch heute noch akzeptiert und gültig (Leinders-Zufall and Zufall, 2013; Leinders-Zufall et al., 2000; Ottoson, 1955): Ein EOG ist eine monophasische, negative Potentialänderung, die durch Aktivierung der Rezeptoren der Riechschleimhaut ausgelöst wird. Innerhalb bestimmter Grenzen ist die Amplitude des Rezeptorpotentials proportional zum Logarithmus der Stimulusintensität. Die wiederholte Stimulation führt auf Grund von Adaptationsmechanismen zu reduzierten Amplituden und verminderter Erregbarkeit (Ottoson, 1955).

Altner und Müller leiteten in den späten 1960ern Elektrovomeronasogramme in verschiedenen Spezies ab. Sie verglichen in ihren Arbeiten die Potentialänderungen von MOE und VNO, also EOG und EVG. Sie stellten fest, dass die bekannten Charakteristika des EOGs und EVGs sich sehr ähnlich sind (Altner and Müller, 1968; Müller, 1971).

### 3.3 Mauslinien

Die Versuche wurden getreu der Leitlinien des Tierethik-Komitees der Universität des Saarlandes durchgeführt. Die Tiere wurden unter zwölfstündigen Tag-Nacht-Zyklen und mit Wasser und Nahrung *ad libitum* im laboreigenen Tierstall gehalten.

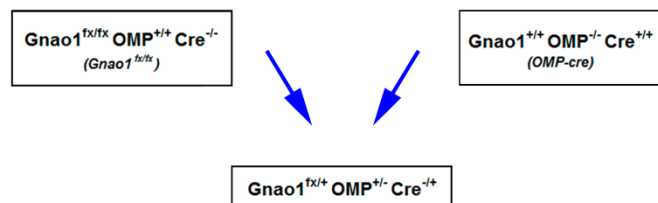
#### 3.3.1 Die konditionelle $G\alpha_o$ -Knockoutmauslinie $cG\alpha_o^{-/-}$

Die  $cG\alpha_o^{-/-}$ -Mauslinie stellt eine gewebsspezifische, konditionelle  $G\alpha_o$ -Knockoutmauslinie dar und wurde im  $G\alpha_o$ -Projekt verwendet. Das G-Protein  $G\alpha_o$  wird vor allem von Nervenzellen exprimiert. Ein globaler Knockout führt zu schwerwiegenden neurologischen Defiziten wie Hyperalgesie, Hyperaktivität und Beeinträchtigung der Motorik. Ferner weisen die Mäuse eine deutlich reduzierte Lebenserwartung auf (Jiang et al., 1998). Um diese Einschränkungen zu umgehen und ein interpretierbares Mausmodell zu generieren, wurde eine gewebsspezifische  $G\alpha_o$ -Knockoutmauslinie mit Hilfe des cre/loxP Systems produziert. Das cre/loxP System erlaubt eine *in vivo* DNA-Rekombination. Eine von loxP-Sequenzen beidseits markierte (gefloxt) definierte DNA-Sequenz wird durch das Enzym cre-Rekombinase (cyclization recombination) entfernt und der DNA-Strang anschließend wieder ligiert (Orban et al., 1992).

Das *Gnao1* Gen kodiert für zwei Splice-Varianten von  $G\alpha_o$ : Variante 1 „ $G\alpha_{o1}$ “ wird durch Exons 1 bis 6, 7.1, 8.1 und 9 kodiert; Variante 2 „ $G\alpha_{o2}$ “ durch Exons 1 bis 6, 7.2 und 8.2 kodiert. Um beide Splice-Varianten zu eliminieren, wurden Exon 5 und 6 mit loxP Sequenzen flankiert: In embryonalen Stammzellen wurde durch homologe Rekombination eine loxP Sequenz in das Intron vor Exon 5 und in das Intron nach Exon 6 eingefügt. Die Nachkommen aus den Blastozysten, welche diese embryonalen Stammzellen erhalten haben, wurden untereinander verpaart, um homozygot gefloxt Nachkommen zu

produzieren ( $Gnao1^{fx/fx}$ ). Diese gefloxtte Mauslinie wurde im Labor von Lutz Birnbaumer hergestellt (Jiang et al., 2002).

Peter Mombaerts produzierte die OMP-cre Mauslinie, die bei *The Jackson Laboratory* kommerziell erwerblich ist. In der OMP-cre Maus ersetzt die cre-Rekombinase das OMP und wird unter Kontrolle des OMP-Promoters exprimiert. OMP steht für „olfaktorisches Marker Protein“ und wird in reifen olfaktorischen und vomeronasalen Neuronen exprimiert. Welche Rolle OMP in diesen Neuronen einnimmt, ist noch nicht vollkommen entschlüsselt. Bekannt ist bisher eine Rolle bei der Reifung von olfaktorisch sensorischen Neuronen und bei Modulation der Kalzium-Homöostase im MOE (Kwon et al., 2009).

**A****B**

	$Gnao1^{fx/+} OMP^{+/-} Cre^{-/+}$		$Gnao1^{fx/+} OMP^{+/-} Cre^{-/+}$	
	$Gnao1^{fx} OMP^{+} Cre^{-}$	$Gnao1^{fx} OMP^{-} Cre^{+}$	$Gnao1^{+} OMP^{+} Cre^{-}$	$Gnao1^{+} OMP^{-} Cre^{+}$
$Gnao1^{fx} OMP^{+} Cre^{-}$	$Gnao1^{fx/fx} OMP^{+/+} Cre^{-/-}$	$Gnao1^{fx/fx} OMP^{+/-} Cre^{-/+}$	$Gnao1^{fx/+} OMP^{+/+} Cre^{-/-}$	$Gnao1^{fx/+} OMP^{+/-} Cre^{-/+}$
$Gnao1^{fx} OMP^{-} Cre^{+}$	$Gnao1^{fx/fx} OMP^{-/-} Cre^{+/+}$	$Gnao1^{fx/fx} OMP^{-/-} Cre^{+/+}$	$Gnao1^{fx/+} OMP^{-/-} Cre^{+/+}$	$Gnao1^{fx/+} OMP^{-/-} Cre^{+/+}$
$Gnao1^{+} OMP^{+} Cre^{-}$	$Gnao1^{+/fx} OMP^{+/+} Cre^{-/-}$	$Gnao1^{+/fx} OMP^{+/-} Cre^{-/+}$	$Gnao1^{+/+} OMP^{+/+} Cre^{-/-}$	$Gnao1^{+/+} OMP^{+/-} Cre^{-/+}$
$Gnao1^{+} OMP^{-} Cre^{+}$	$Gnao1^{+/fx} OMP^{-/-} Cre^{+/+}$	$Gnao1^{+/fx} OMP^{-/-} Cre^{+/+}$	$Gnao1^{+/+} OMP^{-/-} Cre^{+/+}$	$Gnao1^{+/+} OMP^{-/-} Cre^{+/+}$

**Abbildung 7:** Verpaarung der Mauslinien zur Herstellung der gewebspezifischen  $cG\alpha_o^{-/-}$ .  
 A) Verpaarung der gefloxtten  $Gnao1$ -Mauslinie mit der OMP-cre-Mauslinie zur Herstellung der heterozygot gefloxtten/heterozygoten OMP/heterozygoten cre-Mauslinie.  
 B) Die heterozygot gefloxtte/heterozygote OMP/heterozygote cre-Mauslinie wird anschließend untereinander weiter verpaart. Diejenigen Nachkommen, die homozygot gefloxt sind und Cre exprimieren (rot), stellen den gewebspezifischen  $G\alpha_o$ -Knockout dar.

Zur Untersuchung der Funktion von Gao war eine Mauslinie gesucht, die eine auf das olfaktorische System begrenzte Deletion dieses G-Proteins trägt. Daher wurden im Labor von Professor Leinders-Zufall und Professor Zufall (Homburg, Universität des Saarlandes) die Mauslinien  $Gnao1^{fx/fx}$  ( $Gnao1^{fx/fx}$  OMP<sup>+/+</sup> Cre<sup>-/-</sup>) und OMP-cre ( $Gnao1^{+/+}$  OMP<sup>-/-</sup> Cre<sup>+/+</sup>) miteinander verpaart. Die Nachkommen waren sowohl heterozygot gefloxt als auch heterozygot für OMP und cre ( $Gnao1^{fx/+}$  OMP<sup>+/-</sup> Cre<sup>-/+</sup>) (siehe Abbildung 7 A). Diese heterozygote Mauslinie wurde weiter untereinander verpaart, mit dem Ziel homozygot-gefloxt und heterozygot OMP und cre exprimierende Mäuse zu erhalten ( $Gnao1^{fx/fx}$  OMP<sup>+/-</sup> Cre<sup>-/+</sup> beziehungsweise  $Gnao1^{fx/fx}$  OMP<sup>-/+</sup> Cre<sup>+/-</sup>), da in dieser Mauslinie der zu entfernende Gnao1-Gen-Abschnitt auf beiden Allelen flankiert ist, und durch die Expression von cre anschließend in allen OMP-exprimierenden Zellen (also VSNs und OSNs) der gefloxt DNA-Abschnitt herausgeschnitten wird (siehe Abbildung 7 B). Daher stellt diese Mauslinie den gewebsspezifischen Knockout für  $G\alpha_o$  in OMP-exprimierenden Neuronen dar. Dieser wird als  $cG\alpha_o^{-/-}$  (konditioneller Knockout) bezeichnet, da das G-Protein nicht in jungen, immaturren Zellen, sondern erst in adulten, maturaen olfaktorischen Zellen aufgrund der einsetzenden OMP-Expression eliminiert wird.

### 3.3.2 C57BL/6 und $Gnao1^{fx/fx}$ als Kontrollmäuse der $cG\alpha_o^{-/-}$

Sowohl die  $Gnao1^{fx/fx}$ - als auch die OMP-cre-Mauslinien besitzen einen genetischen Mischhintergrund aus den Wildtypmauslinien C57BL/6 und 129/Sv. Neben der  $Gnao1^{fx/fx}$ -Kontrollmauslinie wurde die C57BL/6 Mauslinie als Wildtyp-Kontrolle im  $G\alpha_o$ -Projekt verwendet.

### 3.3.3 Die H2Mv-Knockoutmauslinie $\Delta H2Mv$

Die H2Mv-Knockoutmauslinie wurde im Labor von Peter Mombaerts produziert. Für die Produktion der  $\Delta H2Mv$ -Mauslinie wurde der H2Mv-Genlocus von Chromosom 17 mittels

Chromosomen Engineering herausgeschnitten (Ramírez-Solis et al., 1995). Präparierte embryonale Stammzellen wurden in C57BL/6-Blastozysten injiziert und die entstandenen männlichen Chimäre mit 129/Sv Weibchen verpaart. Nach anschließender Weiterverpaarung der gezüchteten Nachkommen entstanden anschließend parallel mehrere H2Mv-Knockoutmauslinien. Die in dieser Arbeit als  $\Delta$ H2Mv bezeichneten Mäuse entstammen der Linie C und werden daher in der zukünftigen Literatur auch als „ $\Delta$ H2Mv Strain C“ bezeichnet werden (Leinders-Zufall et al., 2014).

#### **3.3.4 129/Sv: die Kontrollmauslinie der $\Delta$ H2Mv**

Durch Rückkreuzung der  $\Delta$ H2Mv-Mauslinie über sieben Generationen wurde der korrespondierende Wildtyp „129/Sv“ produziert. Die 129/Sv-Mauslinie wurde als Kontrolle im  $\Delta$ H2Mv Projekt verwendet.

## 3.4 Lösungen

### 3.4.1 Die extrazelluläre S1-Lösung

Die extrazelluläre Lösung (S1-Lösung) wurde sowohl zur Perfusion des *ex vivo* VNO-Präparates verwendet als auch zur Verdünnung der Liganden auf bestimmte Konzentrationen. Die S1-Lösung setzte sich wie folgt zusammen:

NaCl	120 mmol/l
NaHCO <sub>3</sub>	25 mmol/l
KCl	5 mmol/l
BES (N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure)	5 mmol/l
MgSO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)	1 mmol/l
CaCl <sub>2</sub> (*2H <sub>2</sub> O)	1 mmol/l
Glucose	10 mmol/l

Der pH-Wert der extrazellulären - BES-gepufferten - Lösung S1 lag nach zehnminütiger Begasung mit Carbogen (Gasgemisch 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) bei circa 7,3. Die Osmolarität wurde mit Glukose auf 300 mOsm angeglichen. Die Lösung wurde anschließend durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert, um etwaige Verunreinigungen zu beseitigen. Die S1-Perfusionslösung wurde bei 4 °C maximal 6 Wochen aufbewahrt beziehungsweise verwendet.



### 3.4.2 Die extrazelluläre S2-Lösung

Die extrazelluläre Lösung (S2-Lösung) wurde zur Herstellung von Agar-Gemischen für Ableitelektrode und Referenzelektrode verwendet. Die S2-Lösung setzte sich wie folgt zusammen:

NaCl	145 mmol/l
KCl	5 mmol/l
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure)	10 mmol/l
MgSO <sub>4</sub> (*6H <sub>2</sub> O)	1 mmol/l
CaCl <sub>2</sub> (*2H <sub>2</sub> O)	1 mmol/l
Glucose	10 mmol/l

Der pH-Wert der extrazellulären - HEPES-gepufferten - Lösung S2 wurde mit NaOH auf 7,3 eingestellt. Die Osmolarität wurde mit Glukose auf 300 mOsm angeglichen und die Lösung anschließend durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert, um etwaige Verunreinigungen zu beseitigen. Die Lösung wurde bei 4 °C höchstens zwei Monate aufbewahrt und verwendet.

### **3.5 Stimuli und Pharmaka**

Alle Stimuli wurden direkt vor einem Experiment aus den Stocklösungen produziert. Die mit S1-Lösung verdünnten Stimuli wurden anschließend mit Lebensmittelfarbe gefärbt, um die Stimulusapplikation in der Perfusion des Präparates sichtbar zu machen. Benutzt wurde Lebensmittelfarbe von McCornick (USA), welche keine potentiellen Liganden für olfaktorische Rezeptoren in der Maus besitzt, sodass Reaktionen auf die Lebensmittelfarbe ausgeschlossen werden konnten. In Kontrollexperimenten bestätigte sich, dass olfaktorische und vomeronasale Sinneszellen nicht durch die Lebensmittelfarbe aktiviert werden. Das Verhältnis Lebensmittelfarbe zu Stimulus lag stets bei  $\leq 1$  zu 100.

#### **3.5.1 Produktion des rekombinanten ESP1**

Das ESP1 Plasmid wurde freundlicherweise von K. Touhara (Universität Tokio) zur Verfügung gestellt. Die ESP1-Sequenz wurde in einen Expressionsvektor subkloniert und anschließend in *E. coli* transformiert. Durch künstliche Induktion des Expressionsvektors wurde die Peptidsynthese stimuliert. Mit einem Aufreinigungs-Set hat Dr. Pablo Chamero (Universität des Saarlandes) durch Zelllysisierung und Auswaschen schließlich rekombinantes ESP1 (auch rESP1) gewonnen.

#### **3.5.2 Produktion des rekombinanten MUP25**

Das rekombinante MUP25 wurde mit einem Fusions-Protein-System produziert. Die cDNA des MUP25 wurde aus der Leber einer männlichen C57BL/6 Maus kloniert, anschließend in einen Expressionsvektor subkloniert und in *E. coli* transformiert. Die Expression dieses DNA-Abschnittes ergab ein Fusionsprotein aus MBP (Maltose-bindendes-Protein) und MUP25. Durch mehrere Aufreinigungsschritte hat Dr. Pablo Chamero (Universität des Saarlandes) das Fusionsprotein gewonnen. Im Folgenden gleichbedeutend als MUP25 beziehungsweise

rMUP25 bezeichnet. MBP wurde neben S1-Lösung als weitere Kontrolle für die MUP-Stimulationen verwendet.

### **3.5.3 Produktion der formylierten Peptide und der MHC-Peptide**

F-MFFINTLTL und f-MFFINILTL wurden initial in DMSO gelöst und anschließend mit S1-Lösung zu einer 1  $\mu$ M Stammlösung verdünnt (0,2% DMSO).

F-MFFINTLTL, f-MFFINILTL, f-MFINRWLFS und f-MLF (GeneScript), die MHC-Peptide SYFPEITHI (freundlicherweise von Prof. T. Boehm, MPI Freiburg, zur Verfügung gestellt) und SEIDLILGY (freundlicherweise von Prof. H.G. Rammensee, Tübingen, zur Verfügung gestellt) und das synthetische Hexapeptid W-Peptid WKYMVm (GeneScript) wurden mit S1-Lösung zu 100  $\mu$ M Stammlösungen verdünnt.

### **3.5.4 Produktion der volatilen Stimuli**

Die Duftstoffe 2-Heptanon, Isoamylamin und Isobutylamin (Sigma-Aldrich) wurden in DMSO gelöst und anschließend mit S1-Lösung verdünnt. Die DMSO-Konzentration in den applizierten Duftstoffen lag bei unter 0,1%.

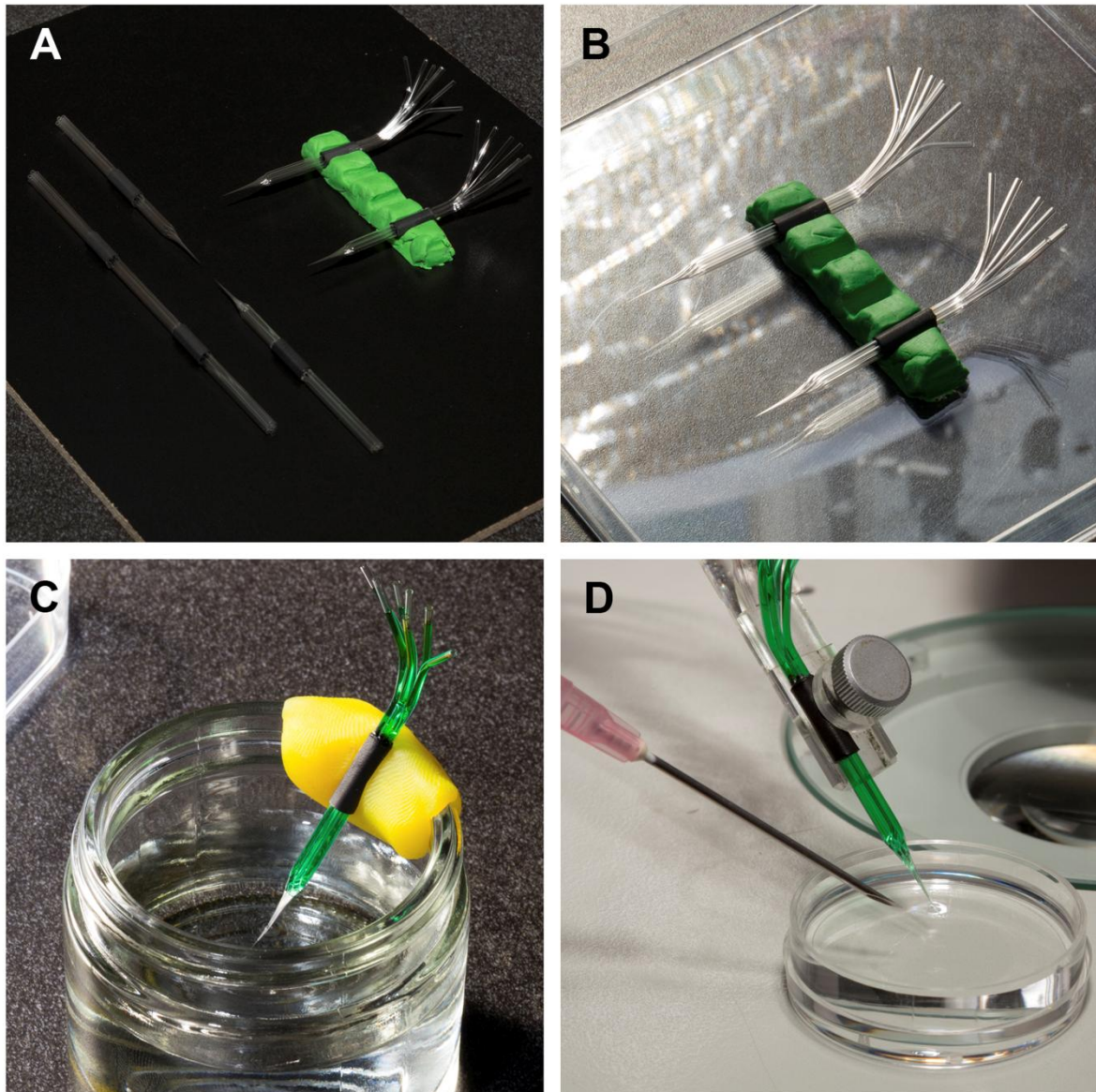
### 3.6 Stimulationspipette

Zur Herstellung der Multi-Stimulationspipette (*multi-barrel pipette*) wurden sieben filamentfreie Borosilikatglas-Kapillare (Innendurchmesser 0,75 mm; Außendurchmesser 1,0 mm) mit Schrumpfschläuchen fixiert. Anschließend wurden die fixierten Kapillare im automatischen Pipettenzieher (PMP-107 Puller, MicroData Instrument) in zwei Schritten erst in der Mitte verdrillt und dann in zwei Pipetten-Rohlinge gezogen. Die sieben Kapillare des nicht-verdrillten Endes wurden über dem Bunsenbrenner erhitzt, um die sieben Kapillare anschließend mit einer Pinzette separieren zu können (siehe Abbildung 8 A und 8 B). Dieses ermöglichte später die Anbringung von Silikonschläuchen auf die Kapillarenden. Per Druckluft-Impuls (via Picospritzer® II) konnten so Stimuli aus den Kapillaren über deren Pipettenspitze lokal appliziert werden.

Mit Hilfe des Narishige EG-400 Microgrinder wurde die Pipettenspitze unter kontinuierlicher Spülung mit destilliertem Wasser auf 45° offen geschliffen. Destilliertes Wasser auf dem Schleifstein verhinderte die Akkumulation von Schleifpartikeln oder Schmutz in der Pipettenspitze während des Schleifvorganges. Durch Kapillarkräfte zog sich während des Schleifens destilliertes Wasser in die Spitze. Der gewinkelte Schliff diente der Erhöhung des Öffnungsdurchmessers der Pipettenspitze. Da die Stimulationspipette während des Experiments gewinkelt in die Badapplikation gestellt wurde, konnte durch den Winkelschliff auch verhindert werden, dass die Badperfusion unmittelbar in die Pipettenspitze gespült wurde (siehe auch Abbildung 12 C).

Der Enddurchmesser der Siebener-Pipetten-Öffnung betrug ungefähr 1,5 µm. Zu große Durchmesser hätten zu Leckage der Stimuli aus der Pipette führen können, und somit Adaptationsprozesse in den Sinneszellen auslösen können. Die Stimulationspipette konnte nach dem Schleifvorgang schließlich mit Stimulationslösungen befüllt werden. Bei der Befüllung mittels selbst hergestellter Spritzenaufsetzer durch die separierten Kapillarenden musste beachtet werden, dass Stimulusfüllung und das destillierte Wasser (aus dem Schleifvorgang) in der Pipettenspitze durch eine Luftphase getrennt blieben, sodass eine

Verdünnung der Stimuli durch Vermischen mit dem destilliertem Wasser ausgeschlossen werden konnte (siehe Abbildung 8 C).



**Abbildung 8:** Die Multi-Stimulationspipette. A) Mit Schrumpfschläuchen fixierte Borosilikatglaskapillaren; zwei Pipetten Rohlinge aus dem automatischen Pipettenzieher; präparierter Rohling mit separierten Enden für die Anbringung von Schrumpfschläuchen. B) Aufbewahrung der fragilen Multi-Stimulationspipette. C) Nach dem Schleifen der Öffnung, Füllung der einzelnen Kapillaren mit den zu applizierenden Stimuli. Die Spitze der Kapillaren kann Durchmesser-bedingt nicht vollständig befüllt werden. D) Nach dem Anbringen der Silikonschläuche des Druckluftspritzers und fixiert im linken Mikromanipulator, erfolgt das Durchspülen der Kapillaren. Die Pipettenspitze zeigt sich nun vollständig befüllt, sodass die Multi-Stimulationspipette einsatzbereit ist. Applikation von Druckluftimpulsen löst so das Ausstoßen gleichgroßer Stimulismengen über die angesteuerte Kapillarspitze aus.

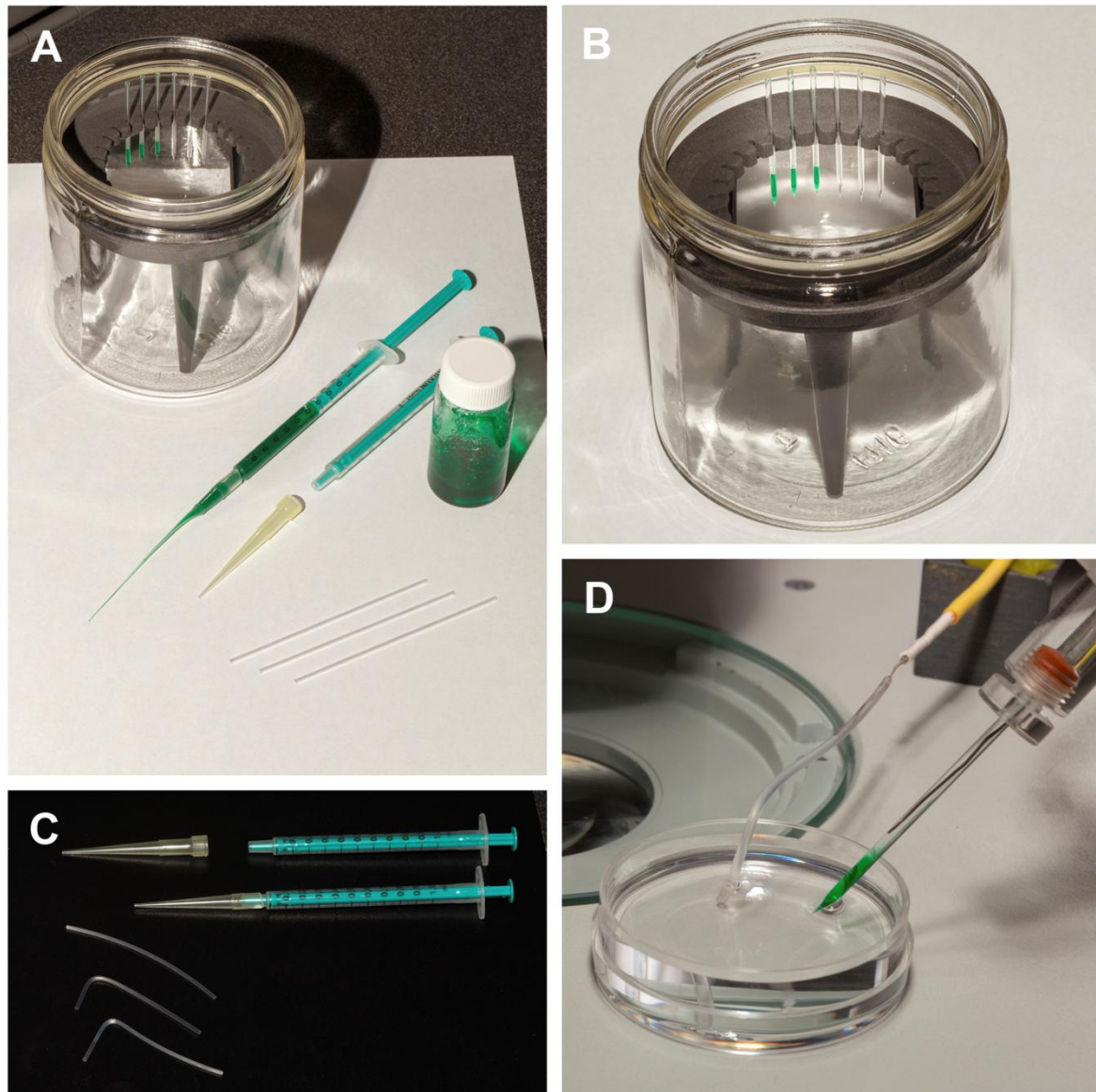
Am EVG-Messplatz wurden die separierten Enden der Stimulationspipette vorsichtig über Silikonschläuche an den Druckluft-Applikator (Picospritzer® II) angeschlossen und anschließend im linken Mikromanipulator fixiert (siehe auch 3.8 Messplatz). Über Impulse definierter Dauer (verstellbar in Millisekunden bis > 99 Minuten; eingestellt wurden 500 ms) und definierter Druckstärke (verstellbar von 1 bis 4 bar, verwendet wurde ungefähr 1,5 bar) wurden kleine Volumina aus der Kapillare fokal appliziert. Das vorherige Ausstoßen einer Luftblase nach mehrmaliger Applikation der Pipette in S1-Lösung garantierte, dass die Wasserphase (aus dem Schleifvorgang) komplett ausgestoßen wurde (siehe Abbildung 8 C und 8D), und dass Stimulus und Wasserphase stets getrennt waren. Die fertig präparierte Stimulationspipette war anschließend bis zur Spitze durchgespült und wurde in S1-Lösung am Messplatz bis zur weiteren Benutzung aufbewahrt (siehe Abbildung 8 D).

## **3.7 Elektroden**

### **3.7.1 Ableitelektrode**

Als Ableitelektrode diente eine mit Agar befüllte Borosilikatglas-Kapillare, die mit S1-Lösung aufgefüllt dann mit einer chlorierten Silberdrahtelektrode verbunden wurde. Die feste Agarphase als Übergang von der in S1-Lösung liegenden chlorierten Silberdrahtelektrode war nötig, da die Feldpotential-Messungen in einem kontinuierlich perfundierten Experiment durchgeführt wurden und eine wässrige Phase hier keine Messungen ohne Perfusionsartefakte erlaubt hätte. Zur Produktion dieser Ableitelektrode wurde eine filamentfreie Kapillare (Innendurchmesser 1,12 mm; Außendurchmesser 1,5 mm) aus Borosilikatglas in zwei Schritten mit dem „Narishige PP-830 Micropipette Puller“ in zwei Rohlinge gezogen. Die Spitzen der Rohlinge wurden anschließend mit einem erhitzten Gemisch aus 3% (w/v) Agar in S2-Lösung und grüner Lebensmittelfarbe (McCormick Grün) befüllt.





**Abbildung 9:** Die Ableitelektrode und die Referenzelektrode. A) und B) Borosilikatglas-Kapillaren werden vom Mikropipetten-Zieher in Rohlinge gezogen. Die Spitzen der Rohlinge werden mit 3% gefärbtem Agar befüllt und anschließend in einem Gefäß aufbewahrt. Dieses wird anschließend mit S2-Lösung befüllt, damit der Agar nicht austrocknet. C) Herstellung der Hülle für die Referenzelektrode (Agarbrücke). Ein über dem Bunsenbrenner geformter Silikonschlauch wird mit 4 % Agar befüllt. D) In wässriger Phase: die Referenzelektrode bestehend aus Agarbrücke und eingeschobener chlorierter Silberdrahtelektrode; die chlorierte Silberdrahtelektrode der Ableitelektrode ist über eine wässrige Phase in der Borosilikatglas-Hülle mit der Agarspitze verbunden.

Dazu wurden aus Pipettierspitzen (200 µl) dünne Spritzenaufsätze von Hand über dem Bunsenbrenner gezogen. Der erhitzte, flüssige Agar wurde in 1 ml Spritzen aufgezogen und über die Spritzenaufsätze konnte der Agar in das untere Drittel der Borosilikatglas-Kapillare gespritzt werden (siehe Abbildung 9 A). Die Lebensmittelfarbe enthielt weder Zucker-

komponenten, welche die Osmolarität hätten beeinflussen können, noch Zusatzstoffe, welche ein artifizielles Rezeptorsignal in der elektrischen Ableitung hätten erzeugen können. Die bei Raumtemperatur abgekühlten Elektroden wurden anschließend unter dem Microforge MF-830 Mikroskop auf eine korrekte Füllung überprüft. Die Elektrode wurde verworfen, wenn der Agar die Elektrodenspitze nicht komplett ausgefüllt hatte, Luftblasen enthielt oder Agar aus der Borosilikatglas-Spitze gelaufen war. Um die korrekt befüllten Elektroden vor Austrocknung und Einschrumpfung zu schützen, wurden diese bei 4 °C in S2-Lösung eingetaucht aufbewahrt (siehe Abbildung 9 B). Vor einem Experiment wurde die korrekte Agarfüllung der Spitze erneut unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurde die Elektrode mit Lösung aufgefüllt, mit der chlorierten Silberdrahtelektrode verbunden und in dem rechten Mikromanipulator (siehe 3.8 Messplatz) fixiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Silberdrahtelektrode vor Experimentbeginn mit Natriumhypochlorit ( $\text{NaClO}$ ) chloriert.

### **3.7.2 Referenzelektrode**

Als Referenzelektrode wurde eine chlorierte Silberdrahtelektrode mit einer Agarbrücke verbunden. Ein erhitztes Gemisch aus 4 % Agar in S2-Lösung wurde mit Hilfe eines Spritzenaufsatzes (siehe Ableitelektrode) in 4 cm lange, über dem Bunsenbrenner rechtwinklig gebogene Polyethylen-Schläuche (Innendurchmesser 1,5 mm) gefüllt (siehe Abbildung 9 C). Die bei Raumtemperatur abgekühlten Agar-Brücken wurden in S2-Lösung bei 4 °C aufbewahrt, und so vor Austrocknung und Einschrumpfung bis zur Verwendung geschützt. Auch die Referenz-Silberdrahtelektrode wurde in regelmäßigen Abständen mit Natriumhypochlorit ( $\text{NaClO}$ ) chloriert.

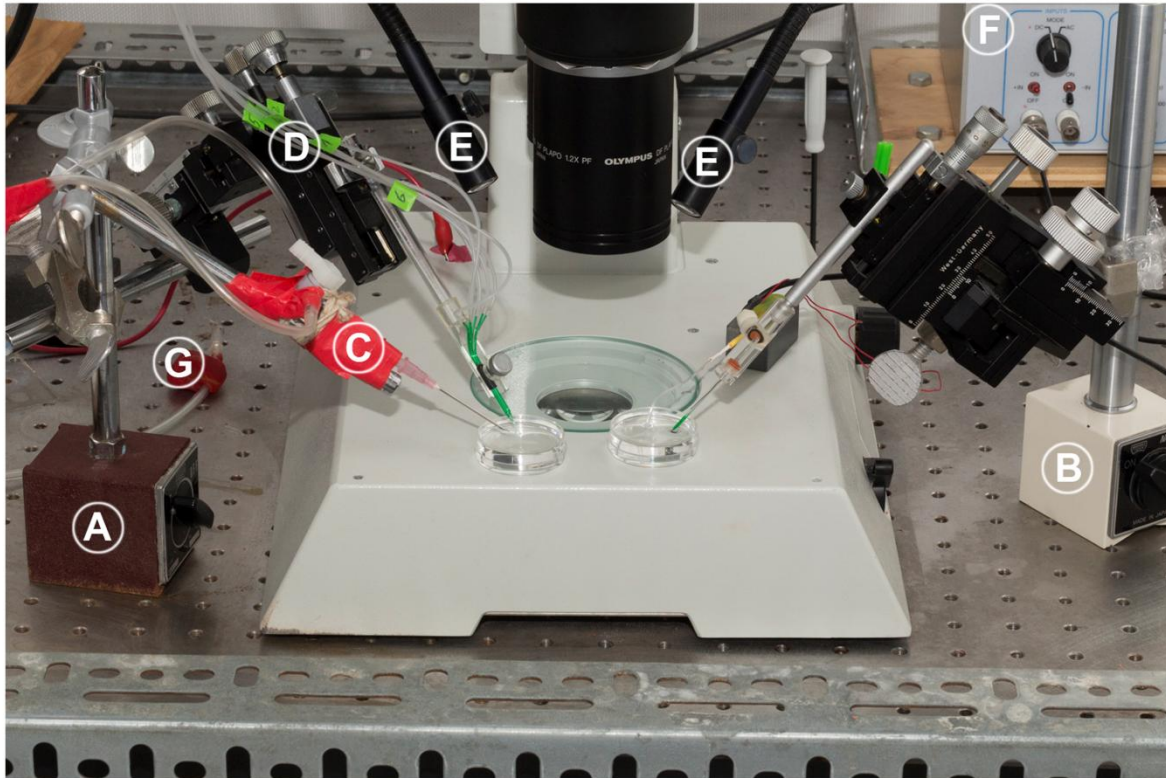


### 3.8 Messplatz

Der schwingungsgedämpfte Tisch (siehe Abbildung 11 I) des Messplatzes war von einem Metallgitter umgeben (siehe auch Abbildung 11 J), um elektromagnetische Felder abzuschirmen (Faradayscher Käfig). Auf dem Tisch befanden sich ein Mikroskop (Olympus SZX12, Abbildung 11 C), zwei Mikromanipulatoren (MM), ein Verstärker und eine Perfusionsvorrichtung. Die beiden Mikromanipulatoren dienten der Befestigung und Steuerung der Stimulationspipette (linker MM, Abbildung 10 A) und der Ableitelektrode (rechter MM, Abbildung 10 B).

Manuell konnten die Mikromanipulatoren in allen drei Ebenen Mikrometer-genau verstellt werden. Zur Durchführung eines Experimentes wurde die Ableitelektrode über einen chlorierten Silberdraht mit einem EPC-Verstärker (Abbildung 10 F) verbunden und im rechten MM fixiert. Die Silberdrahtelektrode lag dabei in der wässrigen S1-Phase der mit S1-Lösung aufgefüllten Agarhülle (siehe auch 3.7.1). Der Vorverstärker war mit einem ITC16 Interface (Schnittstellen-Wandler für analoge und digitale Signale) verbunden, welches das Signal in den Computer (Macintosh Quadra 700) und das Oszilloskop (HITACHI VC-6523) am Messplatz einspeiste.

Mit dem linken Mikromanipulator wurde die Stimulationspipette gesteuert. Silikonschläuche (Abbildung 10 D und Abbildung 11 F) verbanden die separierten Kapillarenden der Stimulationspipette mit dem Druckluft-Applikator (Picospritzer® II). Über ein Drei-Wege-Hahn-System (Abbildung 11 L) wurden manuell einzelne Silikonschläuche angesteuert. Die Stimulusapplikation wurde anschließend per Knopfdruck ausgelöst. Die Perfusionsvorrichtung (50 ml Perfusorspritze mit Infusionsbesteck) hing über der Mikroskopebene (Abbildung 11 D) und wurde vor einem Experiment mit S1-Lösung befüllt. Die S1-Perfusionslösung wurde bei Raumtemperatur kontinuierlich mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) begast und so mit Sauerstoff angereichert (Abbildung 11 E). Der Perfusionsfluss lag bei etwa 60 ml/h.

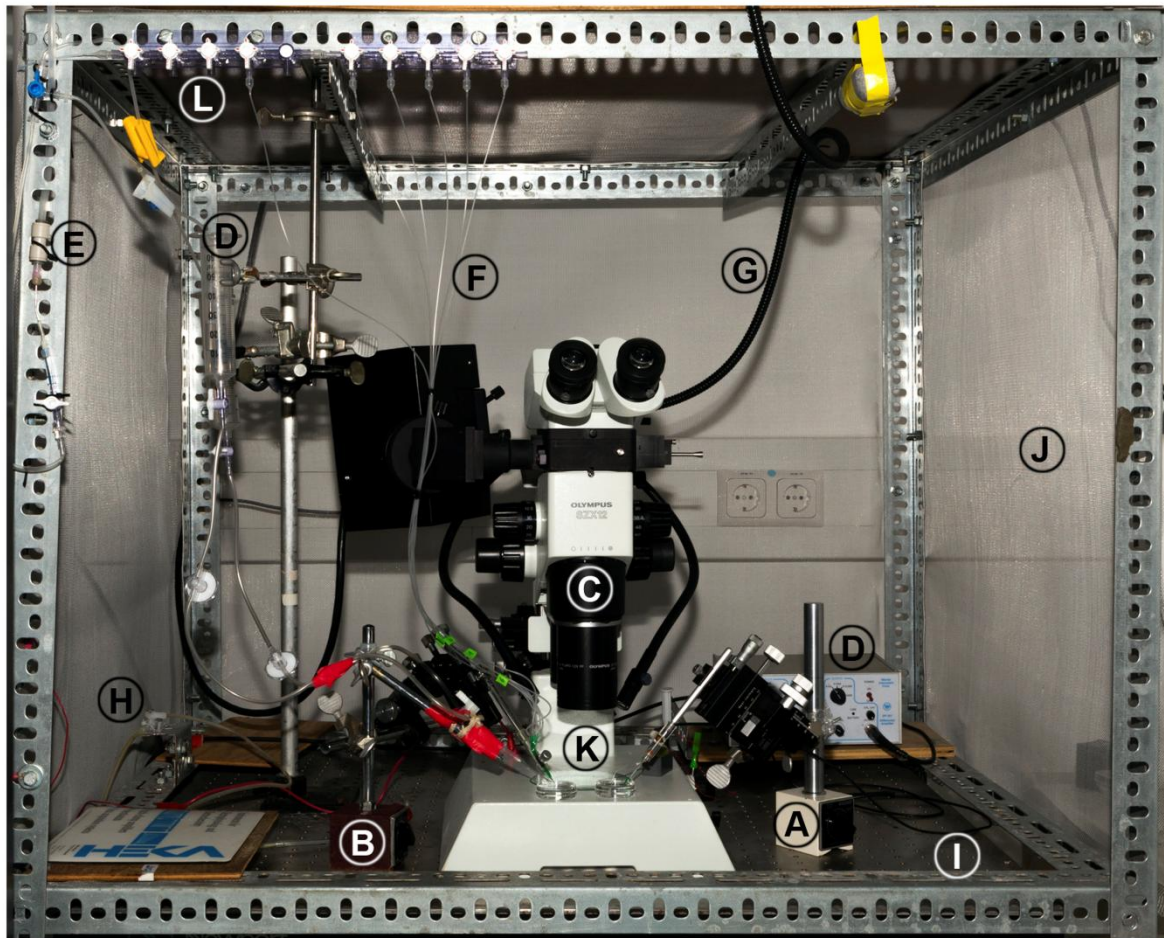


**Abbildung 10:** Nahansicht Messplatz. A) Linker Mikromanipulator für die Perfusionsapplikation und die Fixierung der Multi-Stimulationspipette. B) Rechter Mikromanipulator zur Steuerung der Ableitelektrode. C) Perfusionsapplikation via Spritzenadel. D) Silikonschläuche zur Leitung der Druckluftimpulse auf die Multistimulationspipette. E) Verstellbare Fiberglasoptiken der externen Lichtquelle. F) Verstärker. G) Absaugvorrichtung zur Entfernung verbrauchter Perfusionslösung.

Unter dem Tisch befand sich eine Absaugpumpe. Diese erlaubte die intermittierende Absaugung verbrauchter Perfusionslösung aus der Ableitkammer (Abbildung 10 G und Abbildung 11 H).

Die Ableitkammer wurde ebenfalls selbst hergestellt: eine 9 cm \* 9 cm \* 15 mm große quadratische Petri-Schale wurde mit dem Sylgard® 184 Silikon Elastomer Kit zur Hälfte aufgefüllt. Nach Aushärtung bildete das Silikongemisch eine optimale Grundlage, um das Halbkopfpräparat mit drei speziellen rostfreien Stecknadeln auf dem ausgehärteten, formfesten Silikon zu fixieren.

Über dem Käfig war eine externe Lichtquelle (NCL 150) mit zwei individuell verstellbaren Fiberglasoptik-Armen installiert (Abbildung 10 E). Die Positionierung der Lichtquelle außerhalb des Käfigs gewährleistete Artefakt-freie Potentialmessungen (Abbildung 11 G).



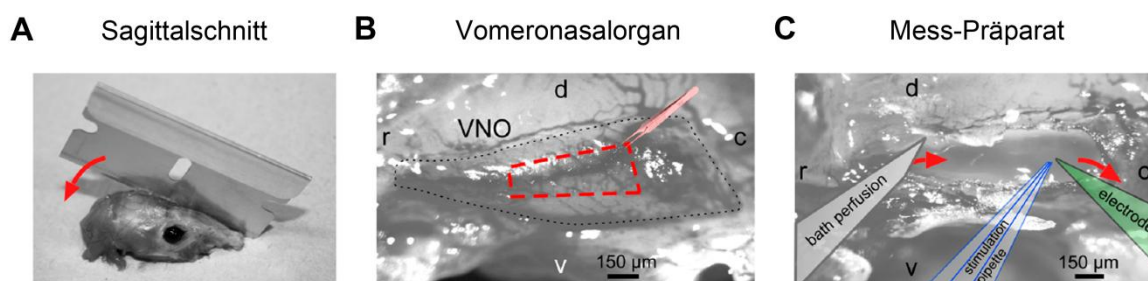
**Abbildung 11:** Gesamtübersicht Messtisch mit Mikroskop. A) Rechter Mikromanipulator mit fixierter Ableitelektrode. B) Linker Mikromanipulator mit Perfusionsapplikation und fixierter Stimulationspipette. C) Tischmikroskop. D) Perfusionsvorrichtung hängend über der Mikroskopebene. E) Carbogen-Zufuhr zum Perfusionsgefäß. F) Silikonschläuche vom Drei-Wege-Hahn-System zur Stimulationspipette. G) Fiberglasoptik der externen Lichtquelle. H) Steuerung der Absaugvorrichtung. I) Schwingungsgedämpfter Messtisch. J) Metallgitter um den Messplatz (Faradayscher Käfig). K) Präparatposition (Experimentebene). L) Drei-Wege-Hahn-System zur Steuerung der Stimulusapplikation.

## 3.9 Experiment

### 3.9.1 Präparation

Zur Anfertigung des Messpräparates wurden Tiere im Alter von 3 Wochen bis 6 Monaten verwendet. Die Maus wurde 20 Sekunden mit CO<sub>2</sub> anästhesiert, anschließend erfolgte die Dekapitation. Das Fell wurde vom Schädelknochen entfernt. Die Schneidezähne des Oberkiefers und der gesamte Unterkiefer wurden entfernt. Anschließend wurde der

präparierte Mauskopf - zwei bis drei Millimeter links-paramedian - sagittal halbiert (siehe Abbildung 12 A). Die eröffnete rechte Präparathälfte wurde mit dem linken Vomeronasalorgan nach oben auf der Ableitkammer fixiert und unter das Mikroskop gelegt. Unter dem Mikroskop wurde die mikrochirurgische Präparation durchgeführt: Conchae nasales wurden entfernt und Septum und Vomeronasalorgan vom respiratorischen Epithel befreit. Aus der knöchern-knorpeligen Kapsel des Vomeronasalorgans wurde mit Hilfe einer Pinzette (Roboz Dumont, Spitzendurchmesser 10  $\mu\text{m}$ ) ein ungefähr 800  $\mu\text{m}$  \* 300  $\mu\text{m}$  großes Rechteckförmiges Segment entnommen (siehe Abbildung 12 B). Dieses ermöglichte den Zugang an das laterale Kompartiment, bestehend aus Schwellkörpergewebe und Blutgefäß (siehe auch 2.3.1 Funktion und Anatomie des AOS, und Abbildung 3: Koronarschnitt durch das Vomeronasalorgan). Das Schwellkörpergewebe wurde rostral mit der Pinzette gegriffen und nach kaudal ziehend in einer Bewegung mitsamt des Blutgefäßes im Inneren entfernt.



**Abbildung 12:** A) Anfertigung des Messpräparates. Für den Zugang zum Vomeronasalorgan wird ein paramedianer Sagittalschnitt durchgeführt. B) Nach Entfernung der Conchae nasales kommt das tubuläre Vomeronasalorgan (VNO) zum Vorschein. In rot skizziert die zu entfernende knorpelig-knöchernen Kapsel des VNO für den Zugriff auf das laterale Kompartiment. C) Nach Entfernung der Kapsel und Resektion des lateralen Kompartiments schaut man von oben auf das Sinnesepithel (glänzend scheinend). Die Badapplikation (bath perfusion), die Stimulationspipette (stimulation pipette) und die Ableitelektrode (electrode) werden in das Präparat geführt. Die roten Pfeile zeigen die Flussrichtung der Badapplikation und damit auch die Richtung der Stimulusauswaschung nach Stimulusapplikation; r = rostral, d = dorsal, c = kaudal, v = ventral. Aus Leinders-Zufall and Zufall (2013).



Kompression des lateralen Kompartiments auf das sensorische Epithel während der Eröffnung der Kapsel oder Berühren des sensorischen Epithels mit der Pinzettenspitze führten unweigerlich zur Schädigung der Dendriten der VSNs und beeinflussten das Gelingen der EVGs erheblich, weshalb es diese Fehler zu vermeiden galt.

Abhängig von den Fließeigenschaften während der Perfusion mit S1-Lösung im Experiment wurden individuell weitere Präparationen vorgenommen: Einzelne Entfernungen von Gaumenknochen, Siebbein, Schädelknochen und/oder Zähnen waren geeignet, um einen optimalen Fluss von rostral nach kaudal im Messpräparat zu erzeugen.

### **3.9.2 Versuchsablauf**

Das angefertigte Messpräparat wurde auf der Ableitkammer unter dem Mikroskop platziert. Die Perfusion wurde so eingerichtet, dass die S1-Nährlösung von rostral nach kaudal über das sensorische Epithel des VNO floss und so applizierte Stimuli sofort ausgewaschen wurden. So konnten Adaptationsprozesse und artifizielle Signale bei Leckage weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Stimations-Pipette wurde mit dem linken Mikromanipulator mikroskopisch-assistiert an das Sinnesepithel herangeführt. Intermittierende repetitive Auslösung des Druckluftspritzers mit grün eingefärbter Kontroll-Lösung (S1) als Stimulus zeigte die Flussrichtung im Präparat an. Die Auswaschdauer des Kontrollstimulus zeigte, ob die Flussgeschwindigkeit adäquat war oder weitere Präparationen notwendig waren. In optimaler Position stand die Stimationspipette im 45° Winkel so im perfundierten VNO, dass die 500 ms dauernde Stimulusapplikation wolkenartig über das Sinnesepithel floss, keine mechanisch-bedingten Artefakte auslöste und der Stimulus unmittelbar durch die Badperfusion ausgewaschen wurde.

Anschließend wurde die Agarbrücke in der Ableitkammer positioniert. Als Referenzelektrode musste sie Kontakt zu der Umgebungsphase (S1-Perfusionslösung) des Präparates haben.

Die Ableitelektrode wurde durch den rechten Mikromanipulator mikroskopisch-assistiert an das sensorische Epithel im VNO herangeführt. Das Oszilloskop wurde im roll-on Modus (live Modus) geführt und stellte die Potentialdifferenzen zwischen Ableit- und Referenzelektrode in Echtzeit dar. Eine alleinige Adjustierung der Ableitelektrode via Mikroskop war auf Grund der fehlenden Hochauflösung und fehlenden adäquaten drei-dimensionalen Visualisierung nicht möglich. Die optimale Position der Ableitelektrode über dem sensorischen Epithel wurde daher mit Hilfe des Oszilloskops eingestellt. Die Elektrode wurde an das Sinnesepithel herangeführt, bis ein minimales artifizielles Signal in Form von diffusen Potentialschwankungen auf dem Oszilloskop erschien. Diese Schwankungen reflektierten den mechanischen Kontakt von Elektrode und Sinnesepithel. Die Elektrode wurde daraufhin so weit zurückgezogen, bis das artifizielle Signal verschwand und die Baseline zurückkehrte.

Nach optimaler Einstellung floss der applizierte Kontroll-Stimulus wolkenartig für kurze Dauer über einen kleinen definierten Bereich um die Ableitelektrode und löste in dieser keine Artefakte aus. Dann konnte die Messung von EVGs begonnen werden. Im Abstand von vier Minuten wurden die verschiedenen Stimuli aus der Multibarrelnpipette appliziert. Bei gleichen Stoffen unterschiedlicher Konzentrationen wurde mit der niedrigsten – dann aufsteigend – begonnen. Als Negativ-Kontrollstimulus wurde eingefärbte S1-Lösung appliziert. Diese Applikation durfte keine mechanischen Artefakte auslösen, ansonsten musste die Stimulationspipette neu positioniert werden.

Bei Potentialänderungen zwischen den Applikationen musste kontrolliert werden, ob die Elektrode noch optimal positioniert war oder Leckagen der Stimulationspipette sichtbar waren. Veränderungen in der Höhe des Perfusionsbades, Abflussbehinderung oder Turbulenzen im Präparat, abgebrochene Pipetten oder Elektrodenspitzen konnten diese Schwankungen begünstigen. Alle möglichen Fehlerquellen mussten dann systematisch ausgeschlossen werden, um das Experiment erfolgreich fortzusetzen. Regelmäßig wurde im Abstand von ca. 10 bis 20 Minuten das Perfusionsgefäß wieder mit S1-Nährlösung aufgefüllt, und die verbrauchte S1-Lösung neben dem Präparat aus der Ableitkammer abgesaugt.

Da die Stimuli im Präparat von rostral nach kaudal ausgewaschen wurden, wurden die VSNs, die kaudal der stimulierten Region liegen, bei jeder Applikation unweigerlich mitstimuliert. Um unnötige Stimulation oder Manipulationen von Sinneszellen zu verhindern, wurden während eines Experimentes sukzessiv Regionen von kaudal nach rostral aufgesucht und stimuliert. So wurde gewährleistet, dass neuaufgesuchte, rostrale Bereiche weitestgehend nativ waren. Pro Experiment wurden ungefähr fünf bis acht unterschiedliche Regionen abgeleitet und das *ex vivo* Präparat wurde maximal für 90 Minuten verwendet.

### 3.10 Fehlereinschätzung

Das Ausmaß der Aktivierung des EVGs wird als maximale Amplitude der Potentialdifferenz gemessen. Diese abgeleitete Potentialdifferenz ist abhängig 1) von der Anzahl der funktionstüchtigen Sinneszellen, die den Rezeptor für den applizierten Stimulus exprimieren und ferner nicht durch die Präparation, die Elektrode, die Stimulationspipette oder die Perfusion beschädigt wurden; 2) vom Abstand der Elektrode zu aktivierten Sinneszellen, da vor allem die Ionenflüsse im unmittelbaren Bereich der Elektrode das Feldpotential beeinflussen 3) vom ausreichenden Vorhandensein und Einstrom positiver Kationen in die Sinneszellen zur Generierung des Rezeptorpotentials.

Bereits 1971 berichtete Müller in seinen Messungen am Vomeronasalorgan von elektrochemischen Reaktionen zwischen Duftstoffen und Messelektroden (Müller 1971 Zeitschrift für vergleichende Physiologie). Ottoson beschrieb ähnliche Phänomene 1956 beim EOG und unterschied zwischen positiven und negativen Potentialen bei EOGs, wobei die negativen Potentialdifferenzen das wahre EOG darstellten (Ottoson, 1955). Diese Idee ist auch heute noch maßgebend bei der Beschreibung der Entstehung der Potentialdifferenzen (Leinders-Zufall et al., 2000). Artefakte können sowohl elektrochemisch als auch mechanisch ausgelöst werden. Leakage der Stimulationspipette, Mikro-Erschütterungen des Präparates oder der Elektrode, und Einschwemmungen von anderen Materialien aus der Nasenhöhle

des Präparates können zu solchen Artefakten führen. Um die Wahrscheinlichkeit von Artefakten so gering wie möglich zu halten, wurden vor und während jedes Experimentes Negativ-Kontrollen (S1-Lösung) und Positiv-Kontrollen (bereits bekannte Liganden wie beispielsweise 2-Heptanon) appliziert. Eine weitere Differenzierung zwischen echter Antwort und Artefakt war auch durch repetitive Stimulation möglich. Physiologische Potentiale wurden auf Grund von Adaptationsmechanismen bei repetitiver oder prolongierter Stimulation kleiner, wohingegen artifizielle Antworten immer die gleiche Feldpotential-Form aufwiesen.

### 3.11 Aussagekraft des EVG

Das EVG ist hervorragend geeignet, um elektrophysiologische Populationsphänomene im vomeronasalen Sinnesepithel zu charakterisieren. Bestimmte Subpopulationen des Neuroepithels reagieren auf die applizierten Liganden und antworten mit einem generierten Rezeptorpotential. Die Potentialdifferenz entsteht durch einen Kationeneinstrom respektive Anionenaustrom über die Zellmembran (Kleene, 2008). Die Summe der generierten Rezeptorpotentiale kann als Summationspotential (Feldpotential) abgeleitet und als Elektrovomeronasogramm dargestellt werden. Auf diese Weise lassen sich die Aktivierung von Rezeptorneuron-Populationen *ex vivo* messen. Beim Elektrovomeronasogramm werden jedoch nicht alle Nervenzellen des gesamten vomeronasalen Sinnespithels, sondern nur ein Teil der VSNs stimuliert (lokale Stimulusapplikation). Aus Rezeptor-Bindungs-Studien ist bekannt, dass maximale Antworten bereits durch submaximale Rezeptorbelegung erreicht werden. Je nach Gewebeart sind Rezeptor-Bindungsraten von unter 10% ausreichend, um maximale Antworten zu generieren (Kenakin, 1986; Lambert, 2004). Auf Grund der Populationsstimulierung (im Gegensatz zur Einzelzellmessung) ist das EVG eine Annäherung an die physiologische Stimulierbarkeit des gesamten VNO. Aussagen, die getroffen werden können, beziehen sich vor allem auf das „alles oder nichts“-Prinzip. Das



heißt, dass ein bestimmter Stimulus entweder in der Lage ist, ein Rezeptorneuron im VNO zu aktivieren oder nicht. Detaillierte Abstufungen zwischen voll-aktivierbar und nicht aktivierbar erfordern eine Vielzahl von durchgeführten Experimenten und eine statistische Interpretation, welche die potentiellen Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten beachtet.

Elektrophysiologische Techniken wie Patch-Clamp-Techniken (Hamill et al., 1981) messen die Stimulierbarkeit auf Einzelzellniveau. Diese sind geeignet, um beispielsweise Signaltransduktionselemente in definierten Subpopulationen zu charakterisieren. Einzelzellmessungen lassen sich jedoch nicht auf die Gesamtpopulation übertragen, wenn nur bestimmte Zell-Subpopulationen eine genetische Veränderung tragen.

Insgesamt ist zu beachten, dass diese Methoden keine Messung einer direkten Stimulation von Rezeptoren darstellen. Eine dem Rezeptor nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade wird als Folge einer Ligandenapplikation aktiviert. Daraufhin entsteht durch Kationeneinstrom und Anionenausstrom über die Zellmembran das Rezeptorpotential, welches als Potentialdifferenz dargestellt wird. Die negative Potentialdifferenz wird nun als Reizantwort beziehungsweise als Sinneszell-Aktivierung interpretiert. Quantifiziert wurden die Potentialänderungen anhand der Maximalamplitude, die ausgelöst wurde. Es wurden nur solche Potentialänderungen gewählt, die als steile Negativ-Deflektion mit anschließender Repolarisation zur Grundlinie ausgelöst wurden. Geringfügige Variationen in der Kinetik der Potentialänderungen beruhen vor allem auf dem experimentellen Design mit variabler Präparation, Stimulusapplikation und Perfusionsapplikation. Da im EVG die Sensitivität der Sinneszellpopulation gemessen wird, sind detaillierte Aussagen über Unterschiede in der Rezeptorkinetik mit EVG-Messungen nicht adäquat möglich.

### **3.12 Dosis-Wirkungs-Kurven**

Zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen Aktivierung vomeronasaler Sinneszellen wurden unter anderem auch Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Hierfür wurde der zu testende

Stimulus in verschiedene Konzentrationsstufen verdünnt und in aufsteigender Konzentration an einem definierten Bereich im VNO appliziert. Es wurden Stimulusintervalle von 4 Minuten eingehalten, um Einflüsse von Adaptationsprozessen weitestgehend auszuschließen. Die für die aufsteigenden Konzentrationen erhaltenen Antworten wurden auf die Maximalantwort der Maximalkonzentration an der jeweils gemessenen Stelle im VNO normalisiert.

### 3.13 Statistik und Mathematik

Zur statistischen Auswertung wurde eine kommerziell erwerbliche Software verwendet (SPSS v21 IBM). Mehrere Gruppen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) und mittels Fisher's least significant difference (LSD) als posthoc Vergleich analysiert. Sofern nicht anders deklariert, wurden die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mit der WaveMetrics IGOR Pro 6 Software erstellt. Die Berechnung der  $EC_{50}$ -Werte wurde mit folgender Formel durchgeführt:

$$f(x) = Eo + \frac{Emax - Eo}{1 + \left(\frac{EC50}{x}\right)^{Hill}}$$

( $Eo$  = Minimum;  $EC_{50}$  = halb-maximaler Effekt;  $Emax$  = Maximum; Hill = Hill-Koeffizient). Mittels iterativen Levenberg-Marquardt Algorithmus (nicht linear) wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven angepasst. Zum Schätzen des „besten Koeffizienten“ wurde in IGOR Pro 6 aus den Rohdaten beim Anpassen der Kurve das Chi-Quadrat ermittelt. Der iterative Levenberg-Marquardt Algorithmus wurde benutzt, um aus wiederholten Schätzungen den Koeffizienten mit dem niedrigsten Chi-Quadrat zu finden. Der Koeffizient mit dem niedrigsten Chi-Quadrat repräsentiert den besten Koeffizienten aus den vorhandenen Rohdaten (Marquardt, 1963).

### 3.14 Verwendete Stimuli mit Konzentrationen

Folgende Stimuli wurden in den Experimenten verwendet:

SYFPEITHI:	$10^{-11}$ M
ESP1:	$10^{-10}$ M, $3 \cdot 10^{-10}$ M, $10^{-9}$ M, $3 \cdot 10^{-9}$ M, $10^{-8}$ M, $3 \cdot 10^{-8}$ M, $10^{-7}$ M
MUP25:	$10^{-10}$ M, $3 \cdot 10^{-10}$ M, $10^{-9}$ M, $3 \cdot 10^{-9}$ M, $10^{-8}$ M, $3 \cdot 10^{-8}$ M, $10^{-7}$ M, $3 \cdot 10^{-7}$ M
2-Heptanon:	$10^{-7}$ M
Isobutylamin:	$10^{-7}$ M
Isoamylamin:	$10^{-7}$ M
F-MLF:	$10^{-7}$ M
F-MFINRWLFS:	$10^{-7}$ M
F-MFFINTLTL:	$10^{-8}$ M, $3 \cdot 10^{-8}$ M, $10^{-7}$ M, $3 \cdot 10^{-7}$ M, $10^{-6}$ M, $3 \cdot 10^{-6}$ M
F-MFFINILTL :	$10^{-7}$ M
W-Peptid:	$10^{-6}$ M
SEIDLILGY:	$10^{-14}$ M, $3 \cdot 10^{-14}$ M, $10^{-13}$ M, $3 \cdot 10^{-13}$ M, $10^{-12}$ M, $3 \cdot 10^{-12}$ M, $10^{-11}$ M, $3 \cdot 10^{-11}$ M, $10^{-10}$ M



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einleitung

Das sensorische Epithel des Vomeronasalorgans besteht aus mindestens zwei Nervenzellschichten, die anhand der Expression von heterotrimeren G-Proteinen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren differenziert werden können. Die apikalen, lumenwärts lokalisierten VSNs exprimieren  $G\alpha_{i2}$  und V1R, die basalen VSNs hingegen exprimieren  $G\alpha_o$  und V2R. Ein Teil der basalen V2R-VSNs koexprimiert eine weitere Multigenfamilie, die H2Mv-Familie. Diese kodiert für nicht klassische MHC-Moleküle der Klasse Ib. Diese MHC-Moleküle werden als Multirezeptorkomplex mit dem heterodimeren V2-Rezeptor auf den Dendriten von V2R/H2Mv<sup>+</sup>-VSNs exprimiert. Die *in vivo* Funktion von H2Mv ist bisher unbekannt. Neben der V1R und V2R-Rezeptorfamilie werden im VNO fünf Formyl-Peptid-Rezeptoren, die mFpr-rs-Familie, exprimiert. Diese sind wie V1R und V2R ebenfalls G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Während mFpr-rs3, -rs4, -rs6 und -rs7 exprimierende VSNs  $G\alpha_{i2}$  koexprimieren, koexprimieren mFpr-rs1-VSNs  $G\alpha_o$  (siehe auch 2.3.2 - 2.3.5 für Chemorezeptoren des VNO).

Die Liganden 2-Heptanon und Isobutylamin sind bekannte Agonisten der V1R/ $G\alpha_{i2}$ -VSNs. Mindestens drei verschiedene Protein- und Peptid-Familien aktivieren V2R/ $G\alpha_o$ -VSNs. Dazu gehören MHC-Peptide, MUPs und ESPs mit ihren prototypischen Liganden SYFPEITHI, MUP25 respektive ESP1. Das Ligandenspektrum der mFpr-rs ist noch weitestgehend unbekannt. Erst eine Studie untersuchte Agonisten der humanen FPRs als potentielle Liganden der mFpr-rs. Humane FPRs erkennen formylierte Peptide (f-Peptide) wie f-MLF, f-MFFINILTL, f-MFFINTLTL, f-MFINRWLFS und das synthetische Hexapeptid „W-Peptid“ (WKYVMv), aber auch Inflammations- und Krankheits-assoziierte Moleküle wie Lipoxin A4, CRAMP und uPAR. Als im Jahr 2009 erstmals die Expression der mFpr-rs im VNO veröffentlicht wurde, entschlüsselten Riviere et al. (2009) f-MLF, Lipoxin A4, CRAMP und uPAR als Agonisten der mFpr-rs mit unterschiedlicher Spezifität für die fünf murinen Formyl-

Peptid-Rezeptoren (siehe auch 2.6.6 Formylierte Peptide und hFPR-aktivierende Peptide) (Rivière et al., 2009).

Das Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Funktion definierter Elemente in der Signaltransduktionskaskade von vomeronasalen Sinneszellen der Maus. Durch Kollaboration mit molekulargenetischen Arbeitsgruppen standen genetisch veränderte Mauslinien zur Verfügung, in denen das zu untersuchende Element ausgeschaltet war.

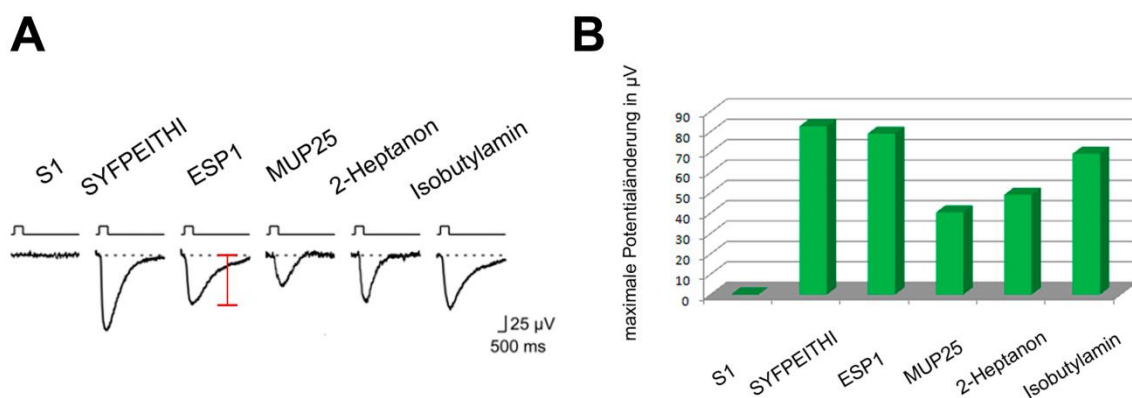
Mittels Ableitung von Stimulus-induzierten Potentialänderungen von der Oberfläche des vomeronasalen Sinnesepithels wurde die elektrische Aktivierbarkeit der VSNs gentechnisch-veränderter Mauslinien gemessen und mit der Aktivierbarkeit der VSNs von Kontrollmauslinien verglichen. Daraus konnten Rückschlüsse auf die Funktion der fehlenden Elemente gezogen werden.

Für die Fragestellungen (siehe auch 2.8 *Fragestellungen und Ziele der Arbeit*) standen eine  $G\alpha_o$ - und eine H2Mv-Knockoutmauslinie zur Verfügung, sodass die Funktionen von  $G\alpha_o$  und H2Mv in der Signaltransduktionskaskade von VSNs untersucht werden konnten.

Anschließend konnten auch die entsprechenden Rezeptorneuron-Subpopulationen von neu identifizierten VNO-Liganden ihren transduzierenden Neuronensubpopulationen zugeordnet werden.

## 4.2 Bekannte Liganden der vomeronasalen Sinneszellen evozieren robuste Feldpotentiale im VNO der Maus

Um zu zeigen, dass das in den Methoden beschriebene Vorgehen bei der Erstellung von Elektrovomeronasogrammen erfolgreich Potentialänderungen auslöst, wurde das VNO der Wildtypmauslinie B6 mit den bekannten V1R-Liganden 2-Heptanon und Isobutylamin und den bekannten V2R-Liganden MUP25, ESP1 und SYFPEITHI stimuliert. Bei einwandfreiem Experiment-Aufbau sollten durch fokale Stimulation neuronaler Subpopulationen lokale Summationspotentiale (Rezeptorpotentiale der vomeronasalen Sinneszellen) abgeleitet werden können. Diese entstehen durch Kationeneinstrom in und Anionenausstrom aus VSNs und können als Potentialänderung registriert werden. Während die fokale Applikation von S1-Perfusionslösung keine elektrische Antwort hervorrief, evozierten die applizierten Liganden SYFPEITHI, ESP1, MUP25, 2-Heptanon und Isobutylamin robuste Potentialänderungen.



**Abbildung 13** A) Lokal abgeleitete Potentialänderungen (EVGs) in B6-Wildtyp. 500 ms Stimulusdauer, Applikation von S1-Kontroll-Stimulus, SYFPEITHI ( $10^{-11}$  M), ESP1 ( $10^{-7}$  M), MUP25 ( $10^{-7}$  M), 2-Heptanon ( $10^{-7}$  M) und Isobutylamin ( $10^{-7}$  M). In rot eingezeichnet die Maximalamplitude ausgelöst durch ESP1-Stimulation. B) Quantifizierung der EVGs anhand der evozierten Maximalamplitude, Mittelwerte als Säulendiagramm. Anzahl und Standardfehler in Abbildung 15.

Diese Potentialänderungen zeichneten sich durch eine steile Negativ-Deflektion mit anschließender Repolarisation zur Grundlinie aus (siehe Abbildung 13 A). Diese beiden Charakteristika reflektieren ein Stimulus-induziertes Generatorpotential in den Sinneszellen, welches sich aus Kationeneinstrom in und Anionenausstrom aus den Sinneszellen zusammensetzt (Kleene, 2008). Anschließend erfolgt die Rückkehr zum Ausgangspotential der Zellmembran (Repolarisation). Daraus folgt, dass bekannte Liganden der V1R- und V2R-VSNs, nicht jedoch die S1-Perfusionslösung (Kontrolle), eindeutige Elektrovomeronasogramme auslösen. Quantifiziert wurden die EVGs anhand der durch Stimulation maximal ausgelösten Negativamplitude zur Grundlinie (siehe Abbildung 13 A rote Markierung). Original-Elektrovomeronasogramme und ein Balkendiagramm mit den jeweiligen Mittelwerten sind in Abbildung 13 dargestellt.



## 4.3 Experimente in der konditionellen $G\alpha_o$ -Knockout-Mauslinie

### 4.3.1 Das G-Protein $G\alpha_o$ ist essentiell für die elektrische Aktivierbarkeit von vomeronasalen V2R-Sinneszellen

VSNs exprimieren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der V1R-, V2R- und mFpr-rs-Genfamilie. Neben den von apikalen und basalen VSNs quantitativ am meisten koexprimierten G-Proteinen  $G\alpha_{i2}$  respektive  $G\alpha_o$  werden weitere G-Protein-Subfamilien wie  $G\alpha_{q/11}$  und  $G\alpha_s$  im VNO exprimiert (Berghard and Buck, 1996; Wekesa, 2003). G-Proteine können sich sehr promiskuitiv verhalten und mit verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagieren (Kostenis et al., 2005). Die Funktion der unterschiedlichen G-Proteine in der Signaltransduktionskaskade von VSNs ist bisher unbekannt. Eine Mauslinie mit einer globalen  $G\alpha_o$ -Deletion stand zwar bereits zur Verfügung, der Phänotyp zeichnete sich jedoch durch schwerwiegende neurologische Defizite aus (Jiang et al., 1998), sodass Resultate einer Untersuchung des Vomeronasalorgans dieser Mäuse nur stark begrenzt hätten interpretiert werden können. Entsprechend sind auch die Ergebnisse von Norlin et al. (2003) nur begrenzt interpretierbar. Die Autoren analysierten den vomeronasalen Phänotyp und das Verhalten einer Mauslinie mit einer globalen  $G\alpha_{i2}$ -Deletion (Norlin et al., 2003). Untersuchungen von Mauslinien mit Deletionen definierter G-Proteine - begrenzt auf das olfaktorische System - sind bisher nicht durchgeführt worden, vor allem weil entsprechende Tiere nicht zur Verfügung standen.

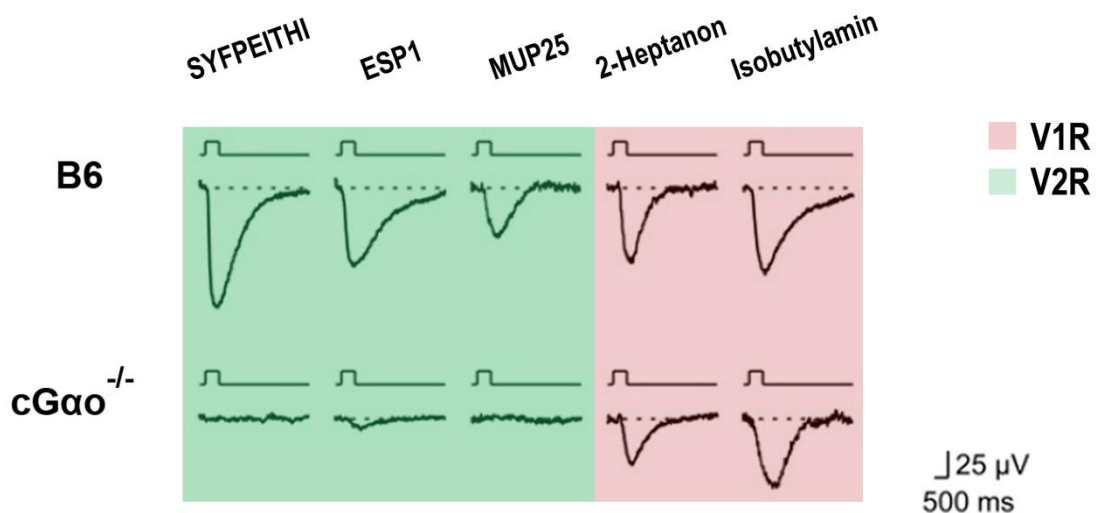
Eine Mauslinie mit einer isolierten Deletion von  $G\alpha_o$  ( $cG\alpha_o^{-/-}$  - konditioneller  $G\alpha_o$ -Knockout) im olfaktorischen System ermöglichte deshalb erstmals die Entschlüsselung der Funktion eines G-Proteins in vomeronasalen Sinneszellen (VSNs).

Falls  $G\alpha_o$  eine Rolle bei der Signaltransduktion von VSNs spielt, dann sollte sich die elektrische Aktivierbarkeit dieser  $G\alpha_o$ -VSNs durch Deletion von  $G\alpha_o$  verändern. Zu erwarten wäre ein reduziertes Summationspotential und damit eine Reduktion der Maximalamplitude der EVGs, sofern kein anderer Mechanismus diesen Verlust kompensiert und das

ausgeschaltete G-Protein keine inhibitorische Funktion bei der elektrischen Aktivierung besitzt.

Um festzustellen, ob die Deletion des G-Proteins  $G\alpha_o$  die Signaltransduktion von VSNs beeinflusst, wurden V1R- und V2R-VSNs in  $cG\alpha_o^{-/-}$  mit den bekannten V1R-Liganden 2-Heptanon und Isobutylamin respektive V2R-Liganden ESP1, MUP25, SYFPEITHI stimuliert.

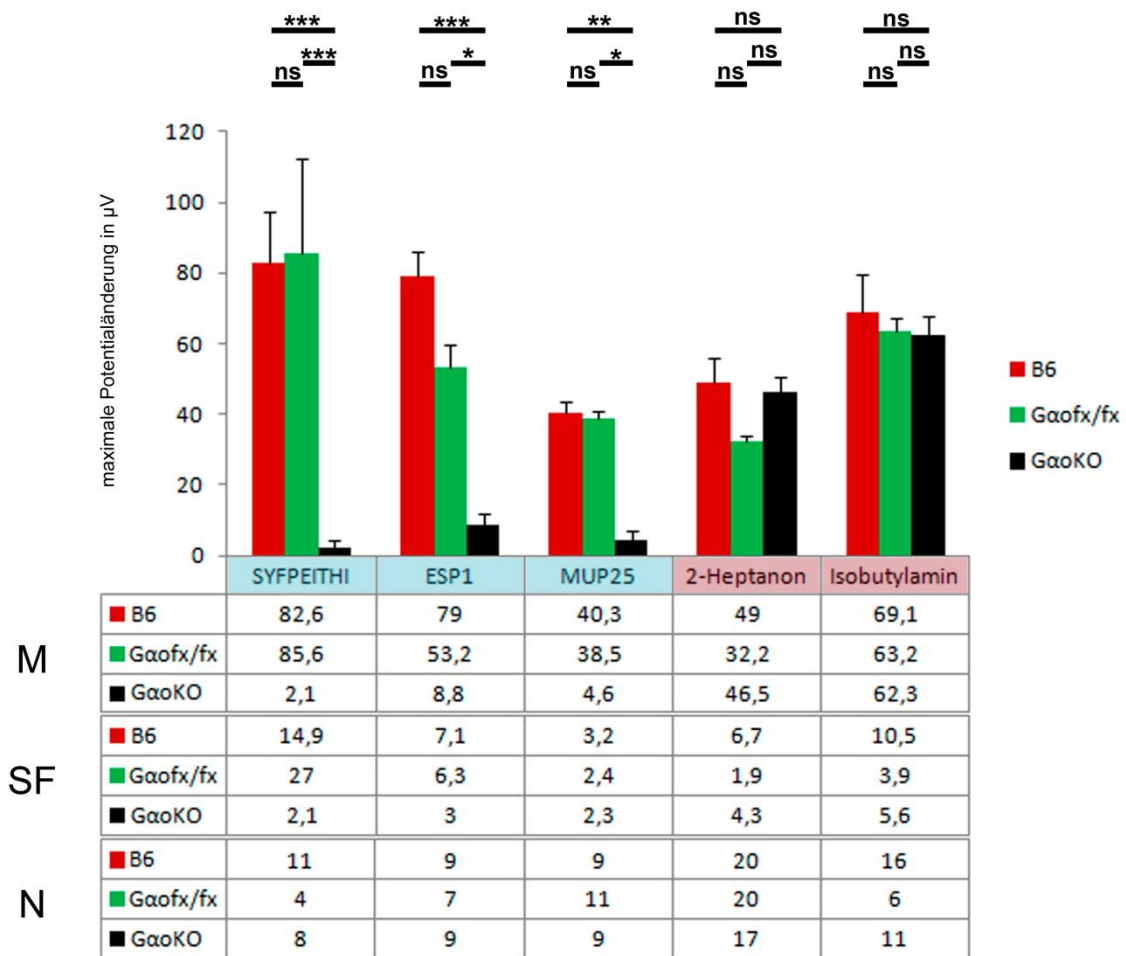
Während die V1R-Liganden in der  $cG\alpha_o^{-/-}$  robuste Feldpotentiale auslösten, waren die Antworten auf die V2R-Liganden in der  $cG\alpha_o^{-/-}$  drastisch reduziert beziehungsweise abwesend (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Lokal abgeleitete Potentialänderungen (EVGs) in B6-Wildtyp und  $G\alpha_o$ -Knockout. 500 ms Stimulusdauer, Applikation von SYFPEITHI ( $10^{-11}$  M), ESP1 ( $10^{-7}$  M), MUP25 ( $10^{-7}$  M), 2-Heptanon ( $10^{-7}$  M) und Isobutylamin ( $10^{-7}$  M).  $G\alpha_o$  ist essentiell für die Aktivierung von V2R-Sinneszellen durch V2R-Liganden.

Da die konditionelle Knockoutmauslinie durch Verpaarung aus  $G\alpha_o^{fx/fx}$  mit OMP-cre produziert wurde, stellt insbesondere die  $G\alpha_o^{fx/fx}$ -Mauslinie die molekulargenetisch korrekte Kontrolle zur  $cG\alpha_o^{-/-}$ -Knockoutmauslinie dar (siehe auch 3.3.1). Daher wurde die Kontrollmauslinie  $G\alpha_o^{fx/fx}$  ebenfalls mit den V1R- und V2R-Liganden stimuliert. Sowohl V1R-

als auch V2R-Liganden waren in der Lage, deutliche Potentialänderungen zu evozieren.



**Abbildung 15:** Mittelwert (M), Standardfehler (SF) und Anzahl (N) der Maximalamplituden: V1R- und V2R-Liganden gemessen in B6,  $G\alpha_o^{fx/fx}$  &  $cG\alpha_o^{-/-}$ . 500 ms Stimulusdauer, Applikation von SYFPEITHI ( $10^{-11}$  M), ESP1 ( $10^{-7}$  M), MUP25 ( $10^{-7}$  M), 2-Heptanon ( $10^{-7}$  M) und Isobutylamin ( $10^{-7}$  M).  $G\alpha_o$  ist essentiell für die Aktivierung von V2R-Sinneszellen durch V2R-Liganden. LSD: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant.

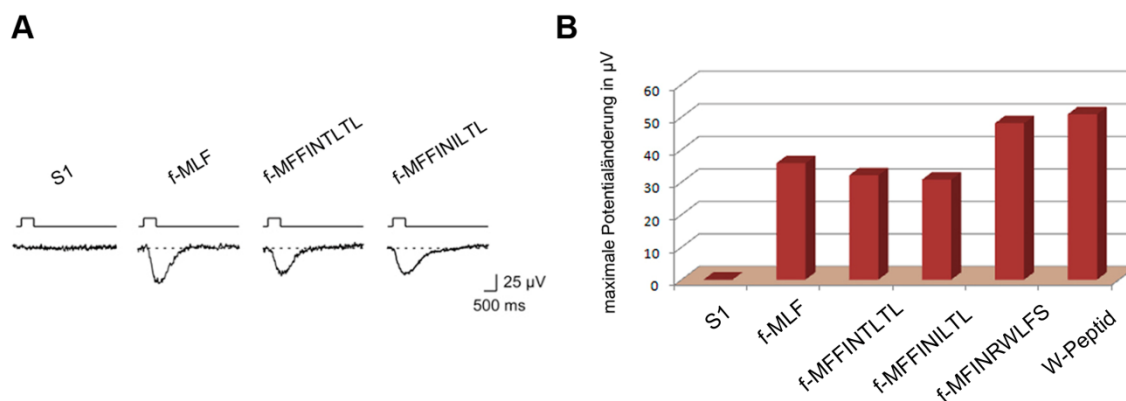
Die EVGs der Kontrollmauslinie  $G\alpha_o^{fx/fx}$  glichen denen der Wildtypmauslinie B6 aus 3.1.1 (LSD:  $p = 0,10 - 0,87$ ). Die elektrophysiologische Übereinstimmung der induzierten Feldpotentiale in diesen beiden Mauslinien ( $G\alpha_o^{fx/fx}$  und B6) ist insofern von besonderer Relevanz, da die Wildtypmauslinie B6 nun ebenfalls – unter Berücksichtigung der genetischen Unterschiede – als Referenzmauslinie der Knockoutmauslinie in Betracht gezogen werden kann. Dieses ist für die Beurteilung des Verhaltensphänotyps von Bedeutung, auf den in der Diskussion genauer eingegangen wird (siehe 4.3). Da im

Gegensatz zur  $G\alpha_o^{fx/fx}$  und B6 in der  $cG\alpha_o^{-/-}$ -Mauslinie nahezu keine Feldpotentiale mehr mit V2R-Liganden induziert werden konnten (siehe Abbildung 15), ist das G-Protein  $G\alpha_o$  essentiell für die Signaltransduktion von V2R-VSNs. Die Stimulierung der V1R-VSNs via 2-Heptanon und Isobutylamin zeigte in  $cG\alpha_o^{-/-}$  die gleichen starken Potentialänderungen wie in  $G\alpha_o^{fx/fx}$  und B6 (LSD:  $p = 0,10 - 0,96$ ), sodass – übereinstimmend mit der Nicht-Expression von  $G\alpha_o$  in V1R/  $G\alpha_{i2}$ -VSNs – diese apikal lokalisierten VSNs von der  $G\alpha_o$ -Deletion unbeeinflusst bleiben. In Abbildung 15 sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Maximalamplituden der fünf applizierten Liganden für die Wildtypmauslinie B6, Kontrollmauslinie  $G\alpha_o^{fx/fx}$  und Knockoutmauslinie  $cG\alpha_o^{-/-}$  dargestellt.

Der V2R-Ligand MUP25 ist als Pheromon in der Lage, aggressives Verhalten in Männchen und laktierenden Weibchen zu induzieren. Da das G-Protein  $G\alpha_o$  essentiell für die Signaltransduktion von V2R-VSNs ist, entsteht die Frage, welche Auswirkungen diese elektrophysiologischen Einbußen für den Verhaltensphänotyp haben, und inwiefern der elektrophysiologische Phänotyp den Verhaltensphänotyp bedingt. Dieser Aspekt wurde von Chamero et al. (2011) untersucht (Chamero et al., 2011) und wird in Zusammenschau mit den hier dargestellten Ergebnissen in Kapitel 4.3 diskutiert.

#### 4.3.2 Agonisten der humanen Formyl-Peptid-Rezeptoren aktivieren auch vomeronasale Sinneszellen

Die Entdeckung einer dritten Rezeptorfamilie im VNO, der m-Formyl-Peptid-Rezeptor-Familie (mFprs-rs), repräsentiert nicht nur eine Zunahme der Rezeptorvielfalt, sondern erweitert höchst wahrscheinlich auch das Ligandenspektrum des akzessorischen olfaktorischen Systems. FPRs werden vor allem von Immunzellen exprimiert. Sie sind benannt nach den formylierten Peptiden, die als prototypische Agonisten dieser Rezeptoren fungieren. F-MLF, CRAMP, uPAR und Lipoxin A4 sind als Liganden der humanen Formyl-Peptid-Rezeptoren in der Literatur beschrieben und konnten durch konfokale Kalziummikroskopie auch als Agonisten der mFpr-rs-Rezeptoren im VNO bestimmt werden (Rivière et al., 2009). Die *in vivo* Funktion der mFprs-rs und das Ligandenspektrum dieser mFpr-rs-Rezeptoren sind weiterhin unbekannt. Auch ist bisher nicht bekannt, inwiefern V1R- oder V2R-VSNs ebenfalls an der Detektion von formylierten Peptiden respektive an der Detektion von hFPR-aktivierenden Molekülen beteiligt sind.



**Abbildung 16:** A) Lokal abgeleitete Potentialänderungen (EVGs) in B6-Wildtyp. 500 ms Stimulusdauer, Applikation von S1-Kontrolle, f-MLF ( $10^{-7}$  M), f-MFFINTLTL ( $10^{-7}$  M), f-MFFINILTL ( $10^{-7}$  M). B) Quantifizierung der EVGs anhand der evozierten Maximalamplituden, Mittelwerte als Säulendiagramm. Anzahl und Standardfehler in Abbildung 18.

Um zu untersuchen, ob weitere Agonisten der humanen Formyl-Peptid-Rezeptoren (hFPRs) in der Lage sind das VNO elektrisch zu aktivieren, wurde das VNO der Wildtypmauslinie B6 mit fünf hFPR-aktivierenden Peptiden stimuliert. Die Applikation der hFPR-aktivierenden Peptide f-MLF, f-MFINRWLFS, f-MFFINILTL, f-MFFINTLTL und W-Peptid konnte robuste Elektrovomeronasogramme hervorrufen (siehe Abbildung 16).

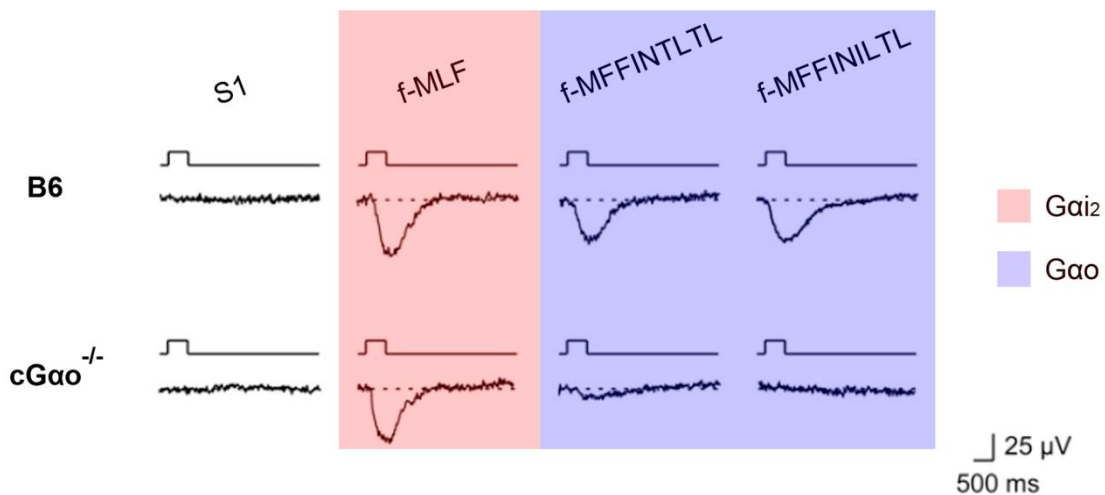
Damit können diese Peptide, die als Aktivatoren der humanen Formyl-Peptid-Rezeptoren fungieren, auch VSNs aktivieren. Offen ist, welche Rezeptoren und welche G-Proteine an der Transduktion dieser Stoffe beteiligt sind, und ob die Erkennung dieser Moleküle eine *in vivo* Funktion besitzt. Original-Elektrovomeronasogramme und die Mittelwerte der Maximalamplituden der fünf applizierten Liganden sind in Abbildung 16 dargestellt.

#### **4.3.3 Einige Agonisten der humanen Formyl-Peptid-Rezeptoren aktivieren ausschließlich $G\alpha_o$ -exprimierende vomeronasale Sinneszellen**

VSNs reagieren auf Stimulation mit hFPR-aktivierenden Peptiden mit robusten Feldpotentialen. Welche Rezeptoren und welche G-Proteine an der Transduktion dieser Peptide beteiligt sind, ist noch unbekannt. Mit der  $cG\alpha_o^{-/-}$ -Mauslinie konnte die Funktion von  $G\alpha_o$  in V2R-VSNs bestimmt werden (siehe 4.3.1). Diese Mauslinie ist ebenfalls geeignet, um die Funktion von  $G\alpha_o$  bei der Signaltransduktion hFPR-aktivierender Peptide zu entschlüsseln. Sie kann Aufschluss darüber geben, ob  $G\alpha_o$  essentiell für die Signaltransduktion ist, oder ob andere G-Proteine wie beispielsweise  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  oder  $G\alpha_s$  für die Signaltransduktion von Bedeutung sein müssen.

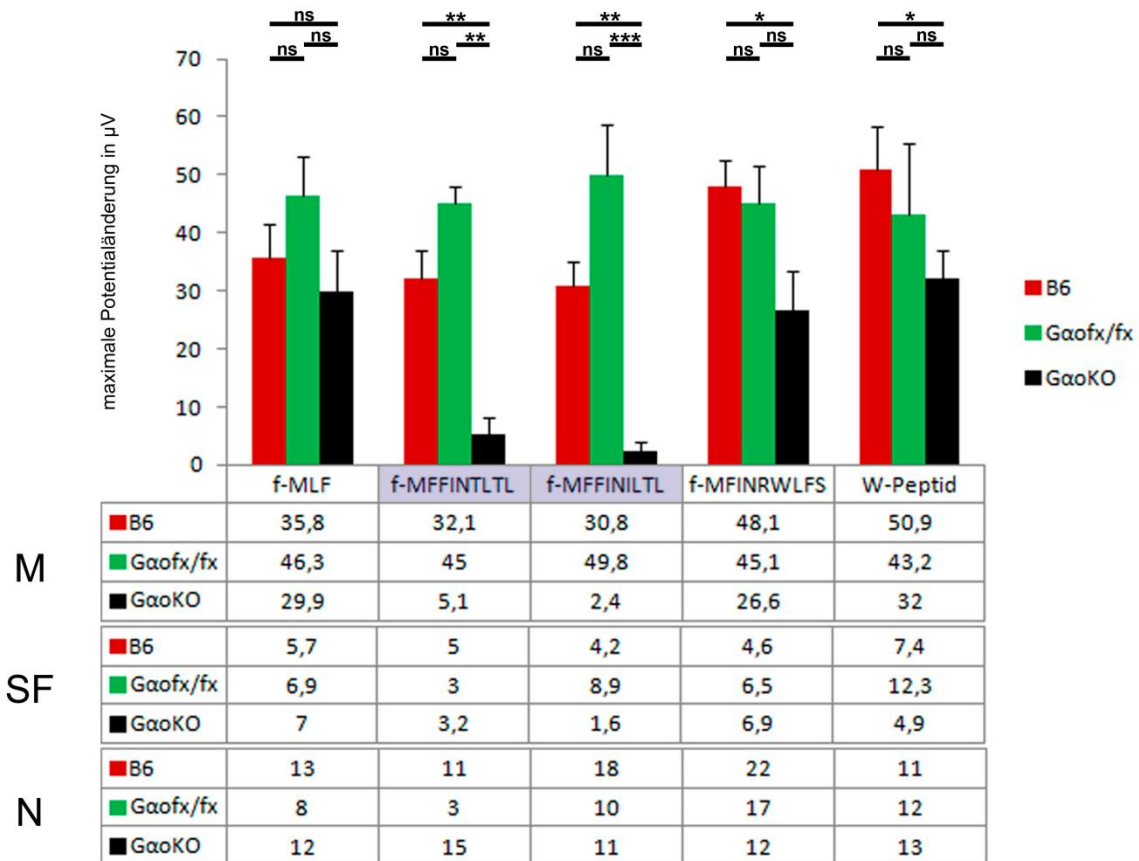
Falls  $G\alpha_o$  eine Rolle bei der Signaltransduktion dieser Liganden spielt, dann sollte sich die elektrische Aktivierbarkeit dieser  $G\alpha_o$ -VSNs durch Deletion von  $G\alpha_o$  verändern. Zu erwarten wäre ein reduziertes Summationspotential und damit eine Reduktion der Maximalamplitude der EVGs, sofern kein anderer Mechanismus diesen Verlust kompensiert und das ausgeschaltete G-Protein keine inhibitorische Funktion bei der elektrischen Aktivierung besitzt.

Um festzustellen, ob die Deletion des G-Proteins  $G\alpha_o$  die elektrische Aktivierbarkeit von VSNs durch hFPR-aktivierende Liganden beeinflusst, wurden  $cG\alpha_o^{-/-}$  mit den fünf hFPR-aktivierenden Peptiden f-MLF, f-MFINRWLFS, f-MFFINILTL, f-MFFINTLTL und W-Peptid stimuliert.



**Abbildung 17:** Lokal abgeleitete Potentialänderungen (EVGs) in B6-Wildtyp und  $G\alpha_o$ -Knockout. 500 ms Stimulusdauer, Applikation von f-MLF ( $10^{-7}$  M), f-MFFINTLTL ( $10^{-7}$  M) und f-MFFINILTL ( $10^{-7}$  M).  $G\alpha_o$  ist essentiell für die Signaltransduktion von f-MFFINTLTL und f-MFFINILTL.

Mit f-MLF, f-MFINRWLFS und W-Peptid lösten drei der fünf applizierten Liganden robuste Feldpotentiale in  $cG\alpha_o^{-/-}$  aus. Sowohl f-MFFINILTL als auch f-MFFINTLTL konnten hingegen nur sehr geringe oder gar keine Potentialänderungen in  $cG\alpha_o^{-/-}$  auslösen (siehe Abbildung 17). In der Kontrollmauslinie  $G\alpha_o^{fx/fx}$  wiederum lösten alle fünf applizierten Liganden, also auch f-MFFINILTL und f-MFFINTLTL, eindeutige Potentialänderungen aus (siehe Abbildung 18). Dass die Vomeronasalneurone der  $cG\alpha_o^{-/-}$  nahezu nicht mehr durch f-MFFINILTL und f-MFFINTLTL aktiviert werden konnten, demonstriert, dass  $G\alpha_o$  essentiell für die Signaltransduktion dieser beiden Peptide ist. Unbekannt ist jedoch noch, welche Rezeptoren an der  $G\alpha_o$ -abhängigen Transduktion beteiligt sind. Sowohl die V2R- als auch die mFpr-rs1-VSNs stellen potentielle Rezeptorneurone dar, da beide Rezeptorfamilien  $G\alpha_o$  koexprimieren.



**Abbildung 18:** Mittelwert (M), Standardfehler (SF) und Anzahl (N) der Maximalamplituden: hFPR-aktivierende Peptide gemessen in B6,  $G\alpha_o^{fx/fx}$  &  $cG\alpha_o^{-/-}$ . 500 ms Stimulusdauer, Applikation von f-MLF ( $10^{-7}$  M), f-MFFINTLTL ( $10^{-7}$  M), f-MFFINILTL ( $10^{-7}$  M), f-MFINRWLFS ( $10^{-7}$  M) und W-Peptid ( $10^{-6}$  M).  $G\alpha_o$  ist essentiell für die Signaltransduktion von f-MFFINTLTL und f-MFFINILTL. LSD: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant.

Die robusten EVGs von f-MLF, f-MFINRWLFS, f-MFFINILTL, f-MFFINTLTL und W-Peptid in  $G\alpha_o^{fx/fx}$  und B6 gleichen sich (LSD:  $p = 0,08 - 0,683$ ), sodass der elektrophysiologische Phänotyp der Kontrollmauslinie mit dem der Wildtypmauslinie übereinstimmt.

Die Feldpotentiale von f-MLF waren in Wildtyp, Knockout und Kontrollmauslinie statistisch nicht verschieden (LSD:  $p = 0,06 - 0,43$ ). Während sich für f-MFINRWLFS und W-Peptid in  $cG\alpha_o^{-/-}$ -Knockout und  $G\alpha_o^{fx/fx}$ -Kontrollmauslinie ebenfalls keine statistischen Unterschiede zeigen (LSD:  $p = 0,32$  respektive  $p = 0,22$ ), sind die Mittelwerte der Maximalamplituden von f-MFINRWLFS und W-Peptid in B6 gegenüber  $cG\alpha_o^{-/-}$  statistisch unterschiedlich. Der Mittelwert von f-MFINRWLFS in  $cG\alpha_o^{-/-}$  mit  $26,64 \mu V$  (SEM =  $6,92 \mu V$ ;  $n = 12$ ) entspricht



ungefähr 55% des Mittelwertes von B6 ( $48,12 \pm 4,56 \mu\text{V}$ ;  $n = 22$ ; LSD:  $p < 0,01$ ). Der Mittelwert von W-Peptid in  $cG\alpha_o^{-/-}$  mit  $32,04 \mu\text{V}$  ( $\text{SEM} = 4,89 \mu\text{V}$ ;  $n = 13$ ) entspricht ungefähr 63% des Mittelwertes von B6 ( $50,90 \mu\text{V} \pm 7,44 \mu\text{V}$ ;  $n = 11$ ; LSD:  $p = < 0,05$ ). Insgesamt weisen die robusten Feldpotentiale von f-MLF, f-MFINRWLFS und W-Peptid in  $cG\alpha_o^{-/-}$  darauf hin, dass diese drei Peptide in der Knockoutmauslinie transduziert werden. Dass sich die Maximalamplituden in Knockoutmauslinie und Kontrollmauslinie  $G\alpha_o^{fx/fx}$  sehr ähnlich sind und sich statistisch nicht signifikant unterscheiden, zeigt deutlich, dass  $G\alpha_o$  nicht essentiell für die Signaltransduktion von f-MLF, f-MFINRWLFS und W-Peptid ist. Dass trotz kräftiger Potentialänderungen dennoch statistisch signifikante Unterschiede für f-MFINRWLFS und W-Peptid zwischen Knockout- und Wildtypmauslinie B6 bestehen, könnte entweder genetisch bedingt oder Experiment-bedingt sein:

(1) Zwischen Knockoutmauslinie  $cG\alpha_o^{-/-}$  und Kontrollmauslinie  $G\alpha_o^{fx/fx}$  gibt es bis auf die Deletion der Exons 5 und 6 im *Gnao1*-Gen (siehe 3.3.1) und der heterozygoten respektive homozygoten Expression von OMP und cre keine genetischen Unterschiede. Die Mauslinie C57Bl/6, welche eine ursprüngliche Wildtypmauslinie darstellt, die seit den 1920er Jahren in Laboren inzüchtig verpaart wird und kommerziell erwerblich ist, unterscheidet sich genetisch sehr viel stärker von der Knockoutmauslinie als die entsprechende Kontrollmauslinie. Das liegt daran, dass die Knockout- und die gefloxt Kontrollmauslinie aus genetischen Mischhintergründen verpaart wurden, um die beabsichtigte genetische Veränderung in das Genom zu bringen. Daraus resultieren genetische Unterschiede in anderen Bereichen, die ursächlich für geringe nicht übereinstimmende Expressionen von Rezeptorneuronen, Signaltransduktions- und/oder Zell-Homöostase-Molekülen im Vomeronasalorgan sein könnten und damit die Signifikanzen begründen könnten.

(2) Ebenso wahrscheinlich sind Experiment-bedingte Ursachen: Die induzierten Summationspotentiale sind abhängig von der Anzahl der vitalen Neurone, welche den Rezeptor für den applizierten Stimulus exprimieren. Außerdem ist die Lage der Ableitelektrode zu den erfolgreich stimulierten Rezeptorneuronen von außerordentlicher

Wichtigkeit für die Maximalamplituden der abgeleiteten EVGs. Die Maximalamplitude der induzierten Potentialänderung stellt die einzige valide Methode der EVG-Quantifikation dar. Sowohl Präparations-bedingte Ursachen, die Lage der Stimulationspipette zum Sinnesepithel als auch die biologische Variabilität der Rezeptorneuron-Expression im VNO können diese Mittelwert-Schwankungen hinreichend erklären.

Während der Experimente bestätigten Negativ-Kontrollen (S1-Lösung) und Positiv-Kontrollen (Potentialänderungen ausgelöst durch andere Liganden), dass die Versuche korrekt ablaufen. Dass die Maximalamplituden sich dennoch geringfügig, aber statistisch signifikant unterscheiden, kann daher als Experiment-bedingt interpretiert werden. Weitere Experimente zur Erhöhung der Anzahl der Messungen können hier weiteren Aufschluss geben.

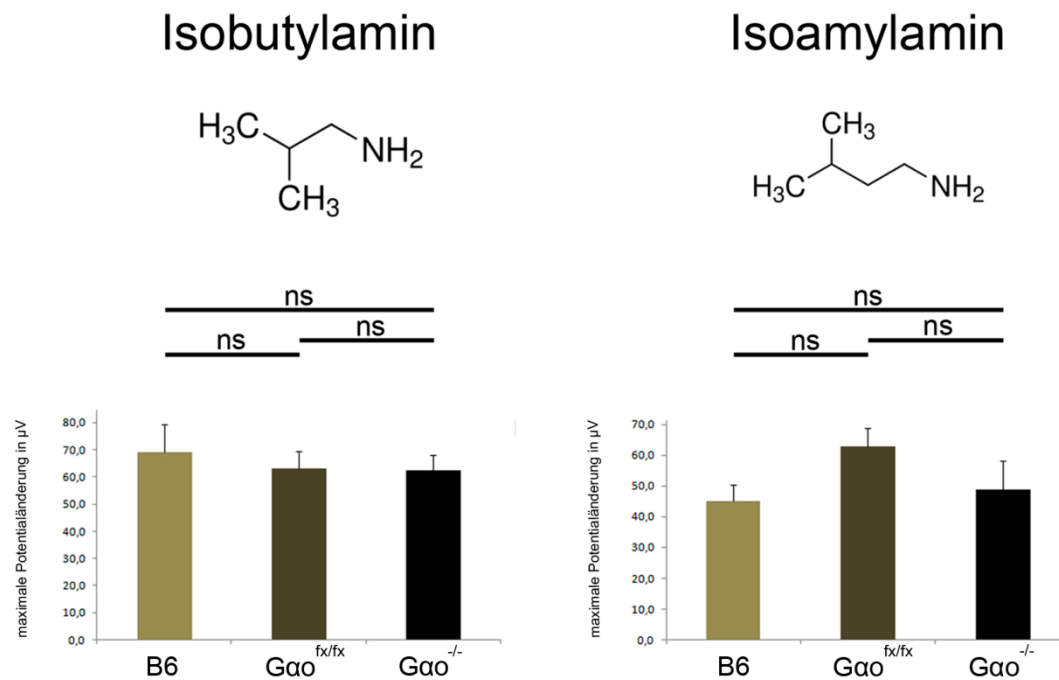
#### **4.3.4 Der volatile Duftstoff Isoamylamin wird von vomeronasalen Sinneszellen detektiert und $G\alpha_o$ -unabhängig transduziert**

Die vomeronasalen Sinneszellen können ein weites Spektrum volatiler Duftstoffe detektieren. Leinders-Zufall et al. (2000) und Del Punta et al. (2002) zeigten, dass beispielsweise 2-Heptanon, Isobutylamin und n-Pentylacetat robuste Elektrovomeronasogramme auslösen (Leinders-Zufall et al., 2000; Del Punta et al., 2002). V1Rb2 und V1R-Cluster Deletionen bestätigten, dass V1R-VSNs die transduzierende Rezeptorneuron-Population im VNO darstellt (Boschat et al., 2002; Del Punta et al., 2002).

Der V1R-Ligand Isobutylamin ( $C_4H_{11}N$ ) ist strukturell eng mit Isoamylamin (*auch Isopentylamin*  $C_5H_{13}N$ ) verwandt (siehe Abbildung 19 chemische Strukturen). Beide volatilen Amine waren in Verhaltensexperimenten in der Lage, die Pubertät von Weibchen zu beschleunigen (Nishimura et al., 1989). Während Isobutylamin von VNO erkannt wird, zeigte eine Studie bisher, dass Isoamylamin vom mTAAR3-Rezeptor im hauptolfaktorischen Epithel erkannt werden kann (Liberles and Buck, 2006).

Ob Isoamylamin auch von Sinneszellen im VNO erkannt wird, war bisher nicht untersucht. Um festzustellen, ob dieser Ligand VSNs elektrisch aktivieren kann, wurde das VNO von

Wildtypmäusen (B6) mit Isoamylamin stimuliert. Isoamylamin-Applikation konnte kräftige Feldpotentiale auslösen. Anschließend wurde Isoamylamin auch in  $cG\alpha_o^{-/-}$  und  $G\alpha_o^{fx/fx}$  appliziert, um zu untersuchen, ob das G-Protein  $G\alpha_o$  an der Signaltransduktion von Isoamylamin beteiligt ist. In allen drei Mauslinien evozierte Isoamylamin wie sein Strukturderivat Isobutylamin charakteristische, nahezu gleichgroße Potentialänderungen (siehe Abbildung 19; LSD: Isoamylamin  $p = 0,287 - 0,503$ ; Isobutylamin  $p = 0,481 - 0,942$ ). Daraus folgt, dass die Signaltransduktion von Isoamylamin  $G\alpha_o$ -unabhängig verläuft und damit höchstwahrscheinlich wie Isobutylamin über die apikalen V1R/G $\alpha_i2$ -VSNs transduziert wird.



**Abbildung 19:** Chemische Struktur Isobutylamin und Isoamylamin. Säulendiagramm mit Mittelwerten + Standardfehler aus Stimulation mit Isobutylamin und Isoamylamin in B6,  $G\alpha_o^{fx/fx}$  und  $cG\alpha_o^{-/-}$ . LSD: ns = nicht signifikant. Pro Genotyp Anzahl  $\geq 3$ .

## 4.4 Experimente in der H2Mv-Knockoutmauslinie

### 4.4.1 Einleitung

Die basal lokalisierten Sinneszellen im VNO exprimieren V2R/G $\alpha_o$ , wohingegen die apikal lokalisierten vomeronasalen Sinneszellen V1R/G $\alpha_{i2}$  exprimieren. Etwa die Hälfte der basalen V2R/G $\alpha_o$ -VSNs koexprimieren eine weitere Multigenfamilie, die H2Mv-Familie. H2Mv kodiert für neun nicht klassische MHC-Moleküle der Klasse Ib und bestimmte Kombinationen dieser Moleküle werden mit V2R als Multirezeptorkomplex auf den dendritischen Verdichtungen von V2R/G $\alpha_o$ /H2Mv<sup>+</sup>-VSNs exprimiert. Die Soma dieser VSNs sind vor allem im unteren Drittel des vomeronasalen Sinnesepithels lokalisiert. Anhand der anatomischen Lokalisation von H2Mv-exprimierenden VSNs kann die basale Sinneszellschicht weiter unterteilt werden. Aus der klassischen Zweiteilung entsteht eine Dreiteilung mit von apikal nach basal folgender Schichtung: V1R/G $\alpha_{i2}$ -VSNs, V2R/G $\alpha_o$ /H2Mv<sup>-</sup>-VSNs und V2R/G $\alpha_o$ /H2Mv<sup>+</sup>-VSNs. Die Funktion von H2Mv im VNO war bisher nur wenig untersucht. Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten mit Überexpression von H2Mv-Genen ließen eine Rolle bei der Oberflächenexpression vermuten (Dey and Matsunami, 2011; Loconto et al., 2003). Diese Annahme lässt sich jedoch nicht auf alle V2R-VSNs verallgemeinern, da nur etwa 50% der V2R-VSNs H2Mv exprimieren. Eine weitere Hypothese involvierte H2Mv als Rezeptor bei der Ligandenerkennung, insbesondere von MHC-Peptiden. Diese Hypothese konnte jedoch zumindest für MHC-Peptide ausgeschlossen werden, da der V2R1b-Rezeptor, der von G $\alpha_o$ /H2Mv-negativen VSNs exprimiert wird, das MHC-Peptid SYFPEITHI hochsensitiv erkennen kann. Die Untersuchung der *in vivo* Funktion von H2Mv war bisher nicht möglich, da eine entsprechende Mauslinie nicht existierte.

#### 4.4.2 H2Mv fungiert nicht als Rezeptor für V2R-Liganden

Durch Kollaboration mit der molekulargenetischen Arbeitsgruppe von Peter Mombaerts (MPI Frankfurt) konnte die *in vivo* Funktion von H2Mv im akzessorischen olfaktorischen System untersucht werden. Mombaerts produzierte eine Mauslinie mit einer homozygoten Deletion des H2Mv-Genclusters ( $\Delta$ H2Mv-Mauslinie) und stellte diese mit der korrespondierenden Kontrollmauslinie 129/Sv zur physiologischen Charakterisierung zur Verfügung.

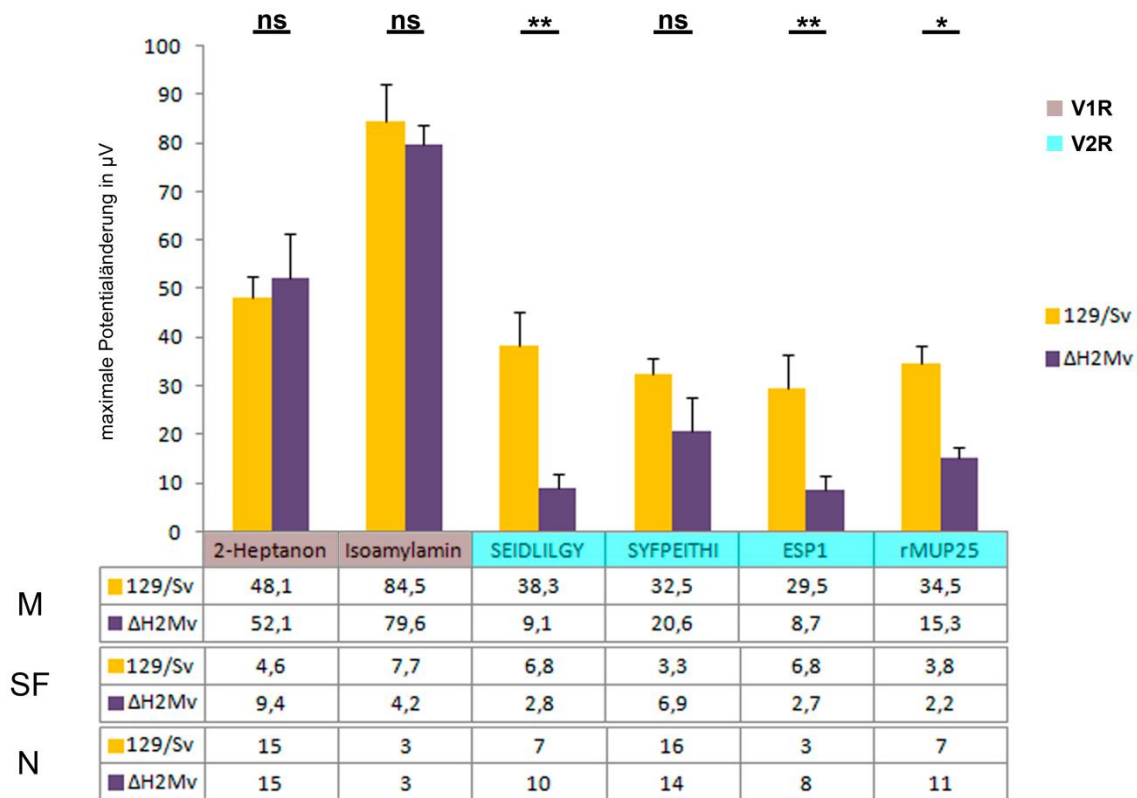
Falls H2Mv in den Mechanismus der Signaltransduktion und damit in die physiologische Aktivierbarkeit von VSNs involviert wäre, dann sollte sich die elektrische Aktivierbarkeit der VSNs durch Deletion der H2Mv-Moleküle verändern.

Um festzustellen, ob die H2Mv-Deletion die Signaltransduktion von VSNs beeinflusst, wurden V1R- und V2R-VSNs in  $\Delta$ H2Mv mit den bekannten V1R-Liganden 2-Heptanon und Isoamylamin respektive V2R-Liganden ESP1, MUP25, SYFPEITHI und SEIDLILGY stimuliert und mit den EVGs der korrespondierenden Kontrollmauslinie 129/Sv verglichen.

Jeder der sechs applizierten Liganden löste kräftige Potentialänderungen in der Kontrollmauslinie 129/Sv aus. Während die V1R-Liganden 2-Heptanon und Isoamylamin in der  $\Delta$ H2Mv ebenfalls robuste Feldpotentiale auslösten (LSD:  $p = 0,61$  respektive  $0,78$ ), waren die Antworten auf SEIDLILGY, ESP1 und rMUP25 in der  $\Delta$ H2Mv gegenüber der 129/Sv drastisch reduziert (ANOVA:  $F_{1, 178} = 23.22$ ,  $p < 0,0001$ ). Die Maximalamplitude der durch rMUP25 ausgelösten Feldpotentiale war in der  $\Delta$ H2Mv wesentlich kleiner als in der 129/Sv, aber dennoch schwach auslösbar (LSD:  $p < 0,05$ ). Ähnlich verhielten sich die Maximalamplituden für ESP1 und SEIDLILGY (LSD:  $p < 0,01$ ).

Der V2R-Ligand SYFPEITHI zeigte bei einer für MHC-Peptide hohen, vermutlich gesättigten Konzentration von  $10^{-11}$  M sowohl in 129/Sv-Kontrollmäusen als auch  $\Delta$ H2Mv Mäusen robuste Feldpotentiale (LSD:  $p = 0,13$ ) (siehe Abbildung 20).

Da die Maximalamplituden von SEIDLILGY, ESP1 und rMUP25 sich zwar erheblich reduziert, aber dennoch auslösbar zeigten, kann ausgeschlossen werden, dass die H2Mv-Expression allein der essentielle Faktor für die Detektion dieser V2R-Liganden ist.



**Abbildung 20:** Mittelwert (M), Standardfehler (SF) und Anzahl (N) der Maximalamplituden: V1R- und V2R-Liganden gemessen in 129/Sv-Wildtyp und  $\Delta$ H2Mv-Knockout. 500 ms Stimulusdauer, Applikation von Heptanon ( $10^{-7}$  M), Isoamylamin ( $10^{-7}$  M), SEIDLILGY ( $10^{-12}$  M), SYFPEITHI ( $10^{-11}$  M), ESP1 ( $3 \cdot 10^{-9}$  M), rMUP25 ( $10^{-8}$  M). LSD: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant. Antworten mehrerer V2R-Liganden reduziert in  $\Delta$ H2Mv gegenüber 129/Sv. Nur der V2R-Ligand SYFPEITHI bei einer gesättigten Konzentration zeigt keine Reduktion in  $\Delta$ H2Mv gegenüber 129/Sv, LSD:  $p = 0,13$ . Die Antworten auf V1R-Liganden zeigen sich in  $\Delta$ H2Mv gegenüber 129/Sv unverändert, LSD:  $p = 0,61 - 0,78$ ).

Die nicht klassischen MHC-Moleküle der Klasse Ib im VNO fungieren daher *nicht* als direkter Rezeptor für diese V2R-Liganden. Diese Beobachtung erweitert die Entdeckung von Leinders-Zufall et al. (2009), dass H2Mv nicht essentiell für die Erkennung von MHC-Peptiden ist (Leinders-Zufall et al., 2009), da H2Mv aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse auch nicht essentiell für die Erkennung von MUP25 oder ESP1 ist.

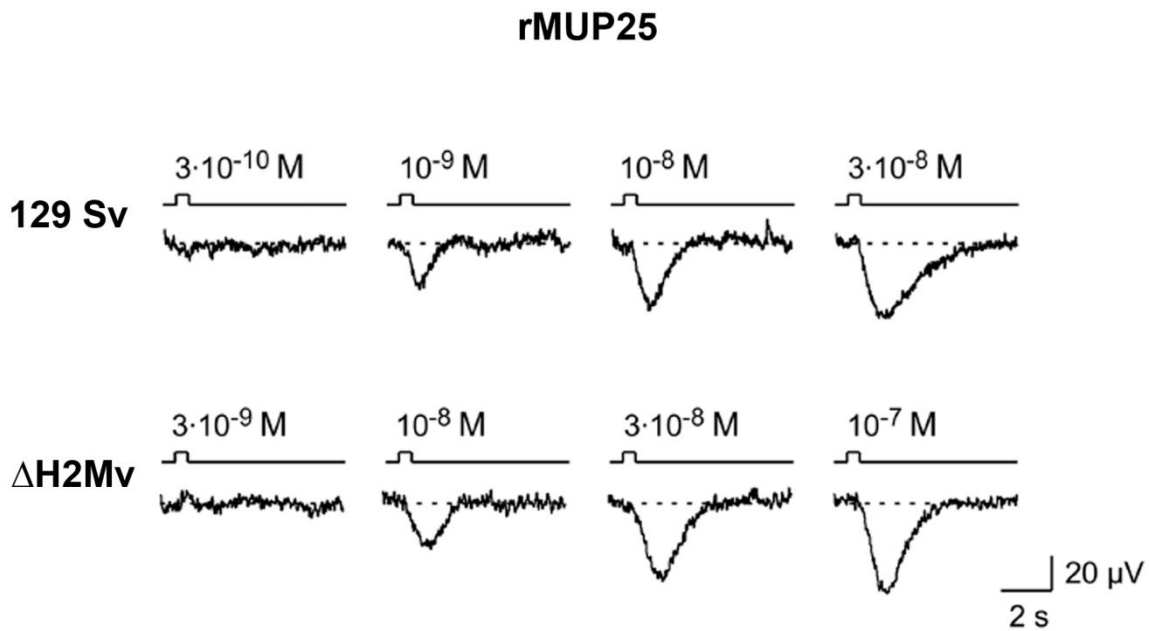
#### 4.4.3 H2Mv trägt zur ultrasensitiven Chemodetektion von V2R-VSNs bei

Die Oberflächenexpression von H2Mv, die Assoziation von H2Mv zum V2R-Rezeptorkomplex und die zwar auslösbaren, aber schwachen Potentialänderungen waren Grundlage für die Hypothese, dass H2Mv eine Rolle als Modulator des V2R-Rezeptorkomplexes spielen könnte.

Um festzustellen, ob H2Mv-defiziente Mäuse überhaupt in der Lage sind, kräftige Feldpotentiale auszubilden, wurde das VNO von  $\Delta$ H2Mv mit aufsteigenden Konzentrationen von rMUP25, ESP1 und SEIDLILGY stimuliert und die Antworten von  $\Delta$ H2Mv mit den EVGs der Kontrollmauslinie 129/Sv verglichen. Abbildung 21 zeigt Elektrovomeronasogramme, die durch sukzessive Erhöhung der Stimulusapplikation (hier rMUP25) von einer definierten Stelle im VNO der entsprechenden Mauslinie abgeleitet worden sind. Während in  $\Delta$ H2Mv Potentialänderungen erst mit  $10^{-8}$  M rMUP25-Stimulation evoziert werden konnten, zeigte die Kontrollmauslinie 129/Sv bereits elektrische Antworten bei Applikation von  $10^{-9}$  M. Eine hohe Konzentration von  $3 \cdot 10^{-8}$  M löste in beiden Mauslinien in etwa gleich große Feldpotentiale aus (siehe Abbildung 21).

Auch die Stimulation mit erhöhten Konzentrationen von ESP1 und SEIDLILGY induzierte in  $\Delta$ H2Mv kräftige Feldpotentiale, deren Maximalamplituden denen der Kontrollmauslinie 129/Sv entsprachen. Daraus folgt, dass die Expression von H2Mv in V2R-VSNs zur ultrasensitiven Chemodetektion von V2R-VSNs beiträgt.

Um das Ausmaß der Sensitivitätsänderung durch H2Mv-Deletion zu quantifizieren, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven für rMUP25, ESP1 und SEIDLILGY in  $\Delta$ H2Mv und 129/Sv erstellt. Dafür wurden in  $n \geq 3$  Tieren aufsteigende Konzentrationen eines definierten Liganden an einer definierten Stelle im VNO appliziert. Die gemessenen Antworten wurden auf die maximal evozierbare Amplitude des benutzten Liganden an dieser definierten Stelle normalisiert.



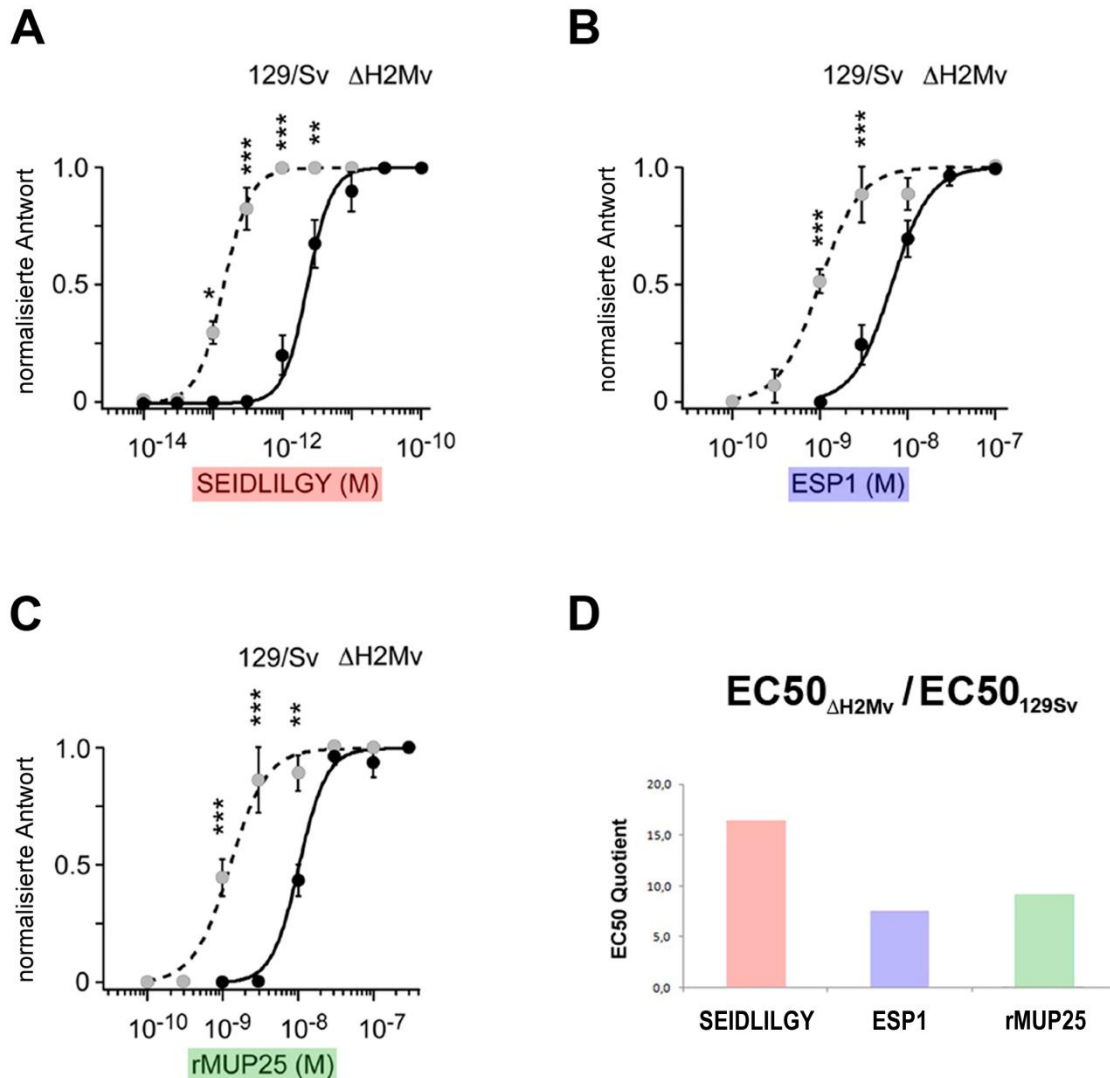
**Abbildung 21:** Konzentrationsabhängige Potentialänderungen evoziert durch rMUP25 in 129/Sv und  $\Delta$ H2Mv.

Die SEIDLILGY-Schwellenkonzentration zur Aktivierung der VSNs in 129/Sv lag bei ungefähr  $10^{-13}$  M. Ab einer Applikation von ungefähr  $10^{-12}$  M wurden Maximalamplituden erreicht, welche sich durch eine weitere Erhöhung der Stimuluskonzentration nicht wesentlich vergrößern ließen. In der  $\Delta$ H2Mv hingegen löste die Applikation von SEIDLILGY in einer Konzentration von  $10^{-12}$  M lediglich sehr kleine Feldpotentiale aus. Durch Erhöhung der Stimuluskonzentration jedoch konnten ebenfalls robuste Feldpotentiale in der  $\Delta$ H2Mv ausgelöst werden. Applikation von SEIDLILGY in einer Konzentration von  $10^{-11}$  M führte in  $\Delta$ H2Mv zu gleich großen Feldpotentialen, wie es  $10^{-12}$  M SEIDLILGY in 129/Sv auslösen konnte. Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels Hill-Gleichung und Levenberg-Marquardt-Algorithmus an die gemessenen Mittelwerte und Standardfehler der Potentialänderungen angepasst ( $\chi^2$  Test:  $p = 0,96 - 0,99$ ) (siehe 3.12 Dosis-Wirkungs-Kurven). Der Hill-Koeffizient in  $\Delta$ H2Mv war im Vergleich zu 129/Sv nahezu unverändert (Hill-Koeffizient mit Standardabweichung: 129/Sv =  $2,259 \pm 0,33$  und  $\Delta$ H2Mv =  $2,51 \pm 0,572$ ; Berechnung nach 3.13 Statistik und Mathematik).

Der direkte Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven von  $\Delta$ H2Mv und 129/Sv für SEIDLILGY



zeigte eine parallele Rechtsverschiebung (siehe Abbildung 22 A).



**Abbildung 22:** A) bis C) Dosis-Wirkungskurven konstruiert aus den Maximalamplituden der EVGs in 129/Sv und  $\Delta$ H2Mv (pro Konzentration  $\geq 3$  Messungen) für A) SEIDLILGY, B) ESP1 und C) rMUP25. Die Antworten eines Liganden mit verschiedenen Konzentrationen wurden an einer definierten Stelle evoziert und auf die Maximalantwort dieses Liganden an der definierten Stelle normalisiert. Illustriert sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Dosis-Wirkungskurven wurden angepasst an die Hill-Gleichung in Kombination mit einem iterativen (nicht-linearen) Levenberg-Marquardt-Algorithmus ( $\chi^2$ -Test  $p = 0,96 - 0,99$ ). Gestrichelte Kurve 129/Sv, kontinuierliche Kurve  $\Delta$ H2Mv. EC<sub>50</sub>-Werte für 129/Sv und  $\Delta$ H2Mv entsprechen jeweils: SEIDLILGY  $1,4 \pm 0,1 \cdot 10^{-13}$  M und  $2,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-12}$  M; ESP1  $9,9 \pm 0,7 \cdot 10^{-10}$  M und  $7,4 \pm 0,7 \cdot 10^{-9}$  M; rMUP25  $1,1 \pm 0,1 \cdot 10^{-9}$  M und  $1 \pm 0,6 \cdot 10^{-8}$  M. LSD: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ . D) EC<sub>50</sub>-Quotient aus EC<sub>50</sub> ( $\Delta$ H2Mv/129Sv) quantifiziert die parallele Rechtsverschiebung der Sensitivität von  $\Delta$ H2Mv-gegenüber 129/Sv für SYFPEITHI, ESP1 und rMUP aus A) – C).

Damit sind Schwellenkonzentration und  $EC_{50}$ -Konzentration in der  $\Delta H2Mv$  gegenüber der 129/Sv um den gleichen Faktor erhöht. Quantifiziert werden kann dieser Faktor anhand des  $EC_{50}$ -Quotienten von  $\Delta H2Mv$  zu 129/Sv (SEIDLILGY  $EC_{50}$  für  $\Delta H2Mv$  respektive 129/Sv:  $2,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-12}$  M und  $1,4 \pm 0,1 \cdot 10^{-13}$  M). Daraus lässt sich eine ungefähre Rechtsverschiebung um den Faktor 16 errechnen (siehe Abbildung 22 D). Dieses bedeutet eine 16-fache reduzierte Sensitivität der V2R-VSNs für SEIDLILGY durch die Deletion von H2Mv.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven für die V2R-Liganden ESP1 und rMUP25 wurden in analoger Weise erstellt und analysiert (siehe Abbildung 22 B respektive Abbildung 22 C). Es zeigten sich ebenfalls nahezu unveränderte Hill-Koeffizienten zwischen  $\Delta H2Mv$  und 129/Sv für ESP1 und rMUP25 (ESP1 Hill-Koeffizient mit Standardabweichung: 129/Sv =  $1,892 \pm 0,404$  und  $\Delta H2Mv$  =  $1,834 \pm 0,278$ ; rMUP25 Hill-Koeffizient mit Standardabweichung: 129/Sv =  $2,68 \pm 1,06$  und  $\Delta H2Mv$  =  $2,4 \pm 0,98$ ). Die  $\Delta H2Mv$ -Konzentrationskurven – und damit Schwellenkonzentration und  $EC_{50}$ -Konzentration – sind um den Faktor 8 und Faktor 10 für ESP1 respektive rMUP25 nach rechts verschoben (ESP1  $EC_{50}$  für  $\Delta H2Mv$  und 129/Sv:  $7,4 \pm 0,7 \cdot 10^{-9}$  M respektive  $9,9 \pm 0,7 \cdot 10^{-10}$  M; rMUP25  $EC_{50}$  für  $\Delta H2Mv$  und 129/Sv:  $1,0 \pm 0,6 \cdot 10^{-8}$  M respektive  $1,1 \pm 0,1 \cdot 10^{-9}$  M).

Die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven erlaubte die Quantifizierung der Sensitivitäts-Modulation durch H2Mv. Durch den Verlust von H2Mv reduziert sich die Sensitivität für V2R-Liganden um das 8- bis 16-fache (siehe Abbildung 22 D), wobei eine Erhöhung der Stimuluskonzentration dennoch die gleichen maximalen Antworten evozieren kann, die auch in Kontrollmäusen hervorgerufen werden.

Die V2R-Liganden rMUP25 und ESP1 sind wichtige Botenstoffe in der chemischen Kommunikation. Beide sind in der Lage, spezifische Verhaltensmuster in der Maus zu stimulieren. Während rMUP25 Aggressionsverhalten in Männchen und laktierenden Weibchen induziert (Chamero et al., 2007, 2011), ist ESP1 als Stimulator des weiblichen Lordose-Verhaltens beschrieben worden, welches die Kopulation vereinfacht (Haga et al., 2010). Da die Sensitivität für beide Liganden in  $\Delta H2Mv$  reduziert ist, stellt sich die Frage, ob auch der Verhaltensphänotyp in dieser Mauslinie verändert ist. Sollten Aggressions- und

Lordoseverhalten tatsächlich reduziert sein, würde anschließend die Fragestellung aufkommen, ob eine Erhöhung der Stimuluskonzentration das physiologische Verhalten wieder induzieren kann und somit der elektrische Phänotyp den Verhaltensphänotyp bedingt. Dieser Aspekt ist von Leinders-Zufall et al. untersucht worden (Leinders-Zufall et al., 2014) und wird in Zusammenschau der hier präsentierten Ergebnisse in 4.4 diskutiert.

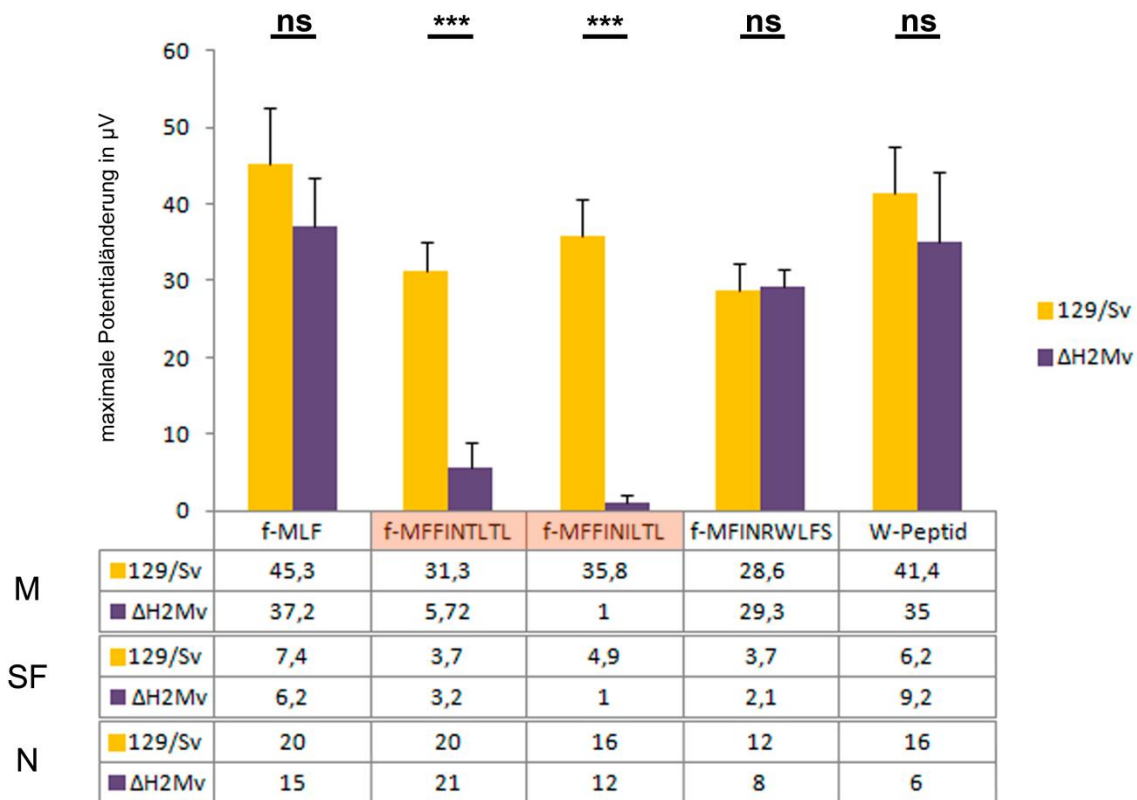
#### 4.4.4 Einige hFPR-aktivierende Peptide sind V2R-Liganden und H2Mv trägt zur ultrasensitiven Chemodetektion dieser Peptide bei

Vomeronasale Sinneszellen sind in der Lage, die fünf hFPR-aktivierenden Peptide f-MLF, f-MFINRWLFS, f-MFFINILTL, f-MFFINTLTL und W-Peptid zu erkennen (siehe 4.3.2). Die Signaltransduktion der mitochondrialen n-formylierten Peptide der NADH-Dehydrogenase 1 (ND1) f-MFFINILTL und f-MFFINTLTL ist abhängig von  $G\alpha_o$ , während f-MLF, f-MFINRWLFS und W-Peptid  $G\alpha_o$ -unabhängig transduziert werden können (siehe 4.3.3). Unbekannt ist, welche  $G\alpha_o$ -VSNs an der Detektion von f-MFFINILTL und f-MFFINTLTL beteiligt sind. Potentielle Rezeptorneuron-Populationen stellen die  $G\alpha_o$ -exprimierenden V2R-VSNs und die mFpr-rs1-VSNs dar. Mit der  $\Delta$ H2Mv-Mauslinie steht eine gentechnisch veränderte Mauslinie zur Verfügung, deren V2R-VSNs eine reduzierte Sensitivität besitzen (siehe 4.4.3). H2Mv wird von einigen V2R-VSNs koexprimiert (Ishii et al., 2003).

Falls H2Mv entscheidend in den Mechanismus der Signaltransduktion von hFPR-aktivierenden Peptiden involviert wäre, dann sollte die elektrische Aktivierbarkeit der VSNs durch die hFPR-aktivierenden Peptide in der H2Mv-defizienten Mauslinie verändert sein.

Um festzustellen, ob die H2Mv-Deletion die elektrische Aktivierbarkeit von VSNs durch hFPR-aktivierende Liganden beeinflusst, wurden  $\Delta$ H2Mv mit den fünf hFPR-aktivierenden Peptiden f-MLF, f-MFINRWLFS, f-MFFINILTL, f-MFFINTLTL und W-Peptid stimuliert.

Die  $G\alpha_o$ -unabhängig transduzierten Peptide f-MLF, f-MFINRWLFS und W-Peptid lösten in  $\Delta$ H2Mv kräftige Potentialänderungen aus, die den Antworten der Kontrollmauslinie 129/Sv gleichen (LSD:  $p = 0,25 - 0,94$ ). Die beiden formylierten Peptide der mitochondrialen ND1 f-MFFINILTL und f-MFFINTLTL hingegen konnten keine, allenfalls nur sehr schwache Potentialänderungen hervorrufen (LSD:\*\*\*  $p < 0,0001$ ) (siehe Abbildung 23). Daraus folgt, dass H2Mv – zumindest bei der applizierten Konzentration von  $10^{-7}$  M – essentiell für die elektrische Aktivierbarkeit der VSNs in  $\Delta$ H2Mv ist. Aus diesen Ergebnissen entstand die Fragestellung, welche Funktion H2Mv bei der Detektion dieser beiden Peptide hat. Folgende zwei Hypothesen waren denkbar:



**Abbildung 23:** Mittelwert (M), Standardfehler (SF) und Anzahl (N) der Maximalamplituden: hFPR-aktivierende Peptide gemessen in 129/Sv-Wildtyp und ΔH2Mv-Knockout. 500 ms Stimulusdauer, Applikation von f-MLF ( $10^{-7}$  M), f-MFFINTLTL ( $10^{-7}$  M), f-MFFINILTL ( $10^{-7}$  M), f-MFINRWLFS ( $10^{-7}$  M) und W-Peptid ( $10^{-6}$  M). LSD: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant.

(1) Die beiden Nonapeptide f-MFFINILTL und f-MFFINTLTL ähneln MHC-Peptiden und könnten daher potentiell als V2R-Liganden fungieren. Da die Deletion von H2Mv die Sensitivität von V2R-VSNs reduziert, könnte die jeweils applizierte Konzentration von  $10^{-7}$  M zu niedrig sein, um die H2Mv-defizienten V2R-VSNs elektrisch zu aktivieren.

(2) H2Mv konnte als essentieller Rezeptor für MHC-Peptide, ESP1 und rMUP25 ausgeschlossen werden, da trotz H2Mv Deletion robuste Feldpotentiale mit diesen Liganden ausgelöst werden können. Die den H2Mv verwandten nicht klassischen MHC-Moleküle H2-M3 besitzen eine sehr hohe *in vivo* Affinität für formylierte Peptide und präsentieren bakterielle und mitochondriale Peptide, unter anderem auch ND1-Peptide (siehe auch 2.3.7). In diesem Zusammenhang wäre eine Rezeptorfunktion von H2Mv für f-Peptide vorstellbar.

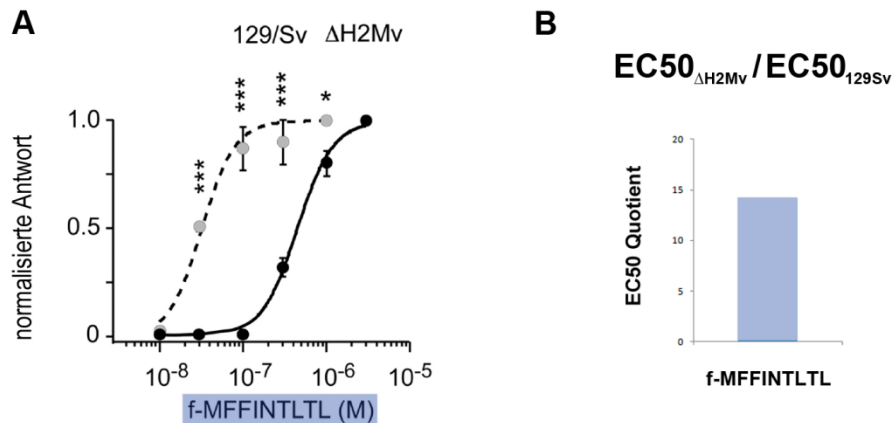
Sollte Hypothese (1) der Fall sein und f-MFFINILTL und f-MFFINTLTL als V2R-Liganden fungieren, so sollte die Erhöhung der Stimuluskonzentration (wie für die V2R-Liganden in 4.3.3) zur elektrischen Aktivierung der VSNs führen.

Sollte hingegen Hypothese (2) zutreffen, und H2Mv als essentieller Rezeptor für die ND-1-Peptide fungieren, so würde trotz Erhöhung der Stimuluskonzentration keine Potentialänderung in  $\Delta H2Mv$  detektierbar sein.

Um festzustellen, welche der beiden Hypothesen zutrifft, wurde das VNO von  $\Delta H2Mv$  mit aufsteigenden Konzentrationen von f-MFFINTLTL stimuliert und die Antworten von  $\Delta H2Mv$  mit den EVGs der Kontrollmauslinie 129/Sv verglichen. Analog zu 4.3.3 wurden die normalisierten Dosis-Wirkungs-Kurven errechnet.

Die f-MFFINTLTL-Schwellenkonzentration zur Aktivierung der VSNs in 129/Sv lag bei ungefähr  $3 \cdot 10^{-8}$  M. Ab einer Applikation von ungefähr  $10^{-7}$  M wurden Maximalamplituden erreicht, welche sich durch weitere Erhöhung der Stimuluskonzentration nicht wesentlich vergrößerte. Die Applikation von f-MFFINTLTL in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M konnte in der  $\Delta H2Mv$  jedoch nur spärliche respektive gar keine Feldpotentiale auslösen. Die Erhöhung der Stimuluskonzentration auf ungefähr  $3 \cdot 10^{-7}$  M führte zur Auslösung von Feldpotentialen in der  $\Delta H2Mv$ . Applikation von f-MFFINTLTL in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M führte in  $\Delta H2Mv$  zu gleich großen Feldpotentialen, wie sie in 129/Sv mit einer Konzentration von  $10^{-7}$  M ausgelöst werden konnten. Der Hill-Koeffizient in  $\Delta H2Mv$  war im Vergleich zu 129/Sv nahezu unverändert (Hill-Koeffizient: 129/Sv =  $2,37 \pm 0,52$  und  $\Delta H2Mv = 2,034 \pm 0,236$ ). Der direkte Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven von  $\Delta H2Mv$  und 129/Sv für f-MFFINTLTL zeigte eine parallele Rechtsverschiebung (siehe Abbildung 24 A).

Damit sind Schwellenkonzentration und  $EC_{50}$ -Konzentration in der  $\Delta H2Mv$  gegenüber der 129/Sv um den gleichen Faktor erhöht. Quantifiziert werden kann dieser Faktor anhand des  $EC_{50}$ -Quotienten von  $\Delta H2Mv$  zu 129/Sv (f-MFFINTLTL  $EC_{50}$  für  $\Delta H2Mv$  respektive 129/Sv:  $4,4 \pm 0,3 \cdot 10^{-7}$  M und  $3,1 \pm 0,3 \cdot 10^{-8}$  M). Daraus lässt sich eine ungefähre Rechtsverschiebung um den Faktor 14 errechnen (siehe Abbildung 24 B). Dieses bedeutet eine 14-fache reduzierte Sensitivität der V2R-VSNs für f-MFFINTLTL durch die Deletion von H2Mv.



**Abbildung 24:** A) Dosis-Wirkungskurve konstruiert aus den Maximalamplituden der EVGs in 129/Sv und  $\Delta$ H2Mv (pro Konzentration  $\geq 3$  Messungen) für f-MFFINTLTL. Die Antworten mit verschiedenen Konzentrationen wurden an einer definierten Stelle evoziert und auf die Maximalantwort an der definierten Stelle normalisiert. Illustriert sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Dosis-Wirkungskurven wurden angepasst an die Hill-Gleichung in Kombination mit einem iterativen (nicht-linearen) Levenberg-Marquardt-Algorithmus ( $\chi^2$ -Test  $p = 0,96 - 0,99$ ). Gestrichelte Kurve 129/Sv, kontinuierliche Kurve  $\Delta$ H2Mv. EC<sub>50</sub>-Werte für 129/Sv und  $\Delta$ H2Mv entsprechen jeweils  $3,1 \pm 0,3 \cdot 10^{-8}$  M und  $4,4 \pm 0,3 \cdot 10^{-7}$  M. LSD: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ . B) EC<sub>50</sub>-Quotient aus EC<sub>50</sub> ( $\Delta$ H2Mv/129Sv) quantifiziert die parallele Rechtsverschiebung der Sensitivität von  $\Delta$ H2Mv-gegenüber 129/Sv für f-MFFINTLTL aus A).

Dass die Erhöhung der Stimuluskonzentration zur elektrischen Aktivierung der H2Mv defizienten VNOs führt, bestätigt Hypothese (1) und widerlegt Hypothese (2). Da H2Mv nicht essentiell für die Erkennung des Peptides ist, kann H2Mv nicht als Rezeptor für dieses f-Peptid fungieren. Im Gegensatz dazu konnte f-MFFINTLTL als V2R-Ligand identifiziert werden, der genau wie die V2R-Liganden ESP1, SEIDLILGY und rMUP25 weniger sensitiv von V2R-VSNs erkannt wird, wenn H2Mv nicht exprimiert wird.





## 5 Diskussion

Im Bereich der Pheromon-Kommunikation sind immer noch viele Fragen unbeantwortet. Aufkommende Fragestellungen betreffen keineswegs nur einzelne, auf Olfaktorik spezialisierte Arbeitsgruppen, sondern binden Disziplinen wie Molekulargenetik, Neurowissenschaften, Verhaltensbiologie und Immunologie. Im Zentrum der Fächer-übergreifenden Diskussion der Pheromon-Kommunikation „vom Gen zum Verhalten“ steht die Signaltransduktion. Verschiedenste chemische Botenstoffe werden nach Bindung an ihre Rezeptoren in ein elektrisches Signal umgewandelt und anschließend in höhere Zentren fortgeleitet und integriert. Die Signaltransduktion des Vomeronasalorgans ist nicht nur auf Grund der besonderen Rolle in der chemischen Kommunikation derzeit Gegenstand intensiver Forschung, sondern auch wegen mannigfaltiger Schnittstellen zwischen den Bereichen Neurowissenschaften und Immunologie, die sich in diesem Organ verbergen.

### 5.1 G-Proteine in der Signaltransduktion von vomeronasalen Sinneszellen

#### 5.1.1 Die Funktion von $G\alpha_o$ in vomeronasalen Sinneszellen

Einige Elemente der Signaltransduktionskaskade der vomeronasalen Sinneszellen (VSNs) sind bereits identifiziert worden und verschiedene, teils aufeinander aufbauende Signaltransduktions-Modelle sind in der Diskussion (siehe 2.3.6 Signaltransduktion im AOS). Das sensorische Epithel des Vomeronasalorgans (VNO) besteht aus mindestens zwei Nervenzellschichten, die anhand der Expression von heterotrimeren G-Proteinen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren differenziert werden können. Während die apikalen,

lumenwärts lokalisierten VSNs die V1-Rezeptorfamilie (V1R) und das G-Protein  $G\alpha_{i2}$  exprimieren, wird von den basal gelegenen VSNs die V2-Rezeptorfamilie (V2R) und das G-Protein  $G\alpha_o$  exprimiert (Chamero et al., 2012). Innerhalb der basalen V2R/ $G\alpha_o$ -Nervenzellschicht kann eine weitere anatomische und zelluläre Differenzierung vorgenommen werden. Während die basalen VSNs des basalen Kompartiments eine weitere Multigenfamilie, die H2Mv-Familie, koexprimieren, exprimieren die VSNs im apikalen Teil des basalen Kompartiments diese Multigenfamilie nicht. H2Mv kodiert für nicht klassische MHC-Moleküle der Klasse Ib. Diese MHC-Moleküle werden als Multirezeptorkomplex mit dem heterodimeren V2-Rezeptor auf den Dendriten von V2R/H2Mv<sup>+</sup>-VSNs exprimiert, sodass aus der klassischen Zweiteilung der vomeronasalen Sinneszellschicht eine Dreiteilung entsteht, mit von apikal nach basal folgender Schichtung: V1R/ $G\alpha_{i2}$ -VSNs, V2R/ $G\alpha_o$ /H2Mv<sup>-</sup>-VSNs und V2R/ $G\alpha_o$ /H2Mv<sup>+</sup>-VSNs (Ishii and Mombaerts, 2008, 2011; Ishii et al., 2003; Loconto et al., 2003). Die Funktion von H2Mv im VNO war bisher nur wenig untersucht. Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten mit Überexpression von H2Mv Genen ließen eine Rolle bei der Oberflächenexpression vermuten (Loconto et al., 2003). Die *in vivo* Funktion von H2Mv ist bisher unbekannt. Neben der V1R- und V2R-Rezeptorfamilie, werden im VNO fünf Formyl-Peptid-Rezeptoren, die mFpr-rs-Familie, exprimiert. Diese sind wie V1R und V2R ebenfalls G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.  $G\alpha_{i2}$  wird von mFpr-rs3, -rs4, -rs6 und -rs7 exprimierenden VSNs koexprimiert,  $G\alpha_o$  hingegen von mFpr-rs1 exprimierenden VSNs (Liberles et al., 2009; Rivière et al., 2009).

Neben den von apikalen und basalen VSNs quantitativ am meisten koexprimierten G-Proteinen  $G\alpha_{i2}$  respektive  $G\alpha_o$  werden weitere G-Protein-Subfamilien wie  $G\alpha_{q/11}$  und  $G\alpha_s$  im VNO exprimiert (Berghard and Buck, 1996; Wekesa, 2003). G-Proteine können sich sehr promiskuitiv verhalten und mit verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagieren (Kostenis et al., 2005). Die Funktion der unterschiedlichen G-Proteine in der Signaltransduktionskaskade von VSNs ist bisher unbekannt.

Für  $G\alpha_{q/11}$  wird eine Beteiligung bei der Signaltransduktion von VSNs angenommen.  $G\alpha_{q/11}$  stellt ein Pertussistoxin (PTX) insensitives G-Protein dar, welches im Gegensatz zu  $G\alpha_o$  und

$G\alpha_{i2}$  durch PTX nicht ADP-ribosyliert – also inaktiviert – werden kann. Da trotz selektiver Blockade von  $G\alpha_o$  und  $G\alpha_{i2}$  in VSNs durch PTX signifikante Konzentrationsanstiege des second-messenger  $IP_3$  nach Urinstimulation detektiert wurden, scheint  $G\alpha_{q/11}$  hierbei involviert (Wekesa et al., 2003). Ein  $G\alpha_{q/11}$ -spezifischer Antikörper konnte die Detektion der V1R-Liganden 2-Heptanon und 2,5-DMP (siehe 1.2.2 Volatile Urin Duftstoffe) Dosis-abhängig blockieren (Thompson et al., 2006). Aus den Veröffentlichungen von Wekesa et al. (2003) und Thompson et al. (2006) lässt sich schlussfolgern, dass  $G\alpha_{q/11}$  an der Signaltransduktion in V1R-VSNs-Liganden beteiligt ist. Inwiefern diese Beteiligung jedoch physiologisch relevant ist, ist nicht untersucht worden. Eine Funktion von  $G\alpha_{q/11}$  in der Signaltransduktion von V2R-VSNs ist bisher ebenfalls ungeklärt.

Eine andere Studie untersuchte eine Mauslinie mit einer globalen Deletion des G-Proteins  $G\alpha_{i2}$ . Neben einer zahlenmäßigen Reduktion der apikalen VSNs auf ungefähr 50% verglichen mit Wildtypmäusen, war auch die c-Fos-Immunoreaktivität auf natürliche Stimuli im akzessorischen olfaktorischen Bulbus (AOB) nicht mehr nachweisbar (Norlin et al., 2003). C-Fos wird bei intakter Chemodetektion unmittelbar nach der Stimulation von VSNs in den Mitral- und den Körnerzellen des AOB exprimiert, und ist in diesem Kontext als Aktivitätsparameter des akzessorischen olfaktorischen Systems etabliert (Brennan et al., 1992). Die globale  $G\alpha_{i2}$ -Deletion führte neben den bereits genannten zellulären Veränderungen auch zu einem veränderten Verhaltensphänotyp mit signifikant reduzierten weiblichen und männlichen Aggressionsverhalten. In dieser Studie von Norlin et al. (2003) wurden jedoch keine funktionellen Untersuchungen der apikalen VSNs vorgenommen, sodass keine Rückschlüsse auf die Funktion von  $G\alpha_{i2}$  in der Signaltransduktion gewonnen werden konnten (Norlin et al., 2003). Vor dem Hintergrund, dass  $G\alpha_{i2}$  ubiquitär, vor allem zentral-nervös exprimiert wird, ist die VNO spezifische Aussagekraft der Studie auf Grund der globalen  $G\alpha_{i2}$ -Deletion limitiert. Bei globaler Deletion eines ubiquitär exprimierten Proteins könnten auch Defekte in anderen zentral-nervösen Regionen den Verhaltensphänotyp beeinflussen, sodass das reduzierte Aggressionsverhalten der globalen  $G\alpha_{i2}$ -Knockout nicht zwangsläufig durch die VNO Beeinträchtigung bedingt ist. Um den

Einfluss anderer zentral-nervöser Defekte auf die Signaltransduktion und Phänotypbeurteilung ausschließen zu können, sollte eine möglichst gewebspezifische, also hier VNO-spezifische Deletion der G-Protein-Klassen untersucht werden. Eine solche isolierte G-Protein Untersuchung im Vomeronasalorgan hatte bisher noch nicht stattgefunden.

### 5.1.2 Die konditionelle Knockoutmauslinie $cG\alpha_o^{-/-}$

Durch Verpaarung der geflochten Mauslinie  $Gnao1^{fx/fx}$  (Lutz Birnbaumer) und der OMP-cre-Mauslinie (Peter Mombaerts) wurde die konditionelle  $G\alpha_o$ -Knockoutmauslinie  $cG\alpha_o^{-/-}$  in Homburg produziert (siehe auch 3.3.1 die konditionelle  $G\alpha_o$ -Knockoutmauslinie). Diese war gesund, fertil und zeigte im Gegensatz zur globalen  $G\alpha_o$ -Knockoutmaus keine offensichtlichen neurologischen Defizite wie Hyperalgesie, Hyperaktivität oder Beeinträchtigung der Motorik (Chamero et al., 2011; Jiang et al., 1998). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Professor Leinders-Zufall und Dr. Pablo Chamero wurde die Funktion des G-Proteins  $G\alpha_o$  im Vomeronasalorgan der Maus untersucht. Die von Chamero et al. (2011) durchgeführten immunhistochemischen Färbungen bestätigten die Abwesenheit von  $G\alpha_o$ -Immunreaktivität des  $G\alpha_o$ -Antikörpers sowohl im Vomeronasalorgan (VNO) als auch im akzessorischen olfaktorischen Bulbus (AOB) des konditionellen Knockouts.

Immunohistochemische Experimente mit Antikörpern gegen die Phosphodiesterase 4A (PDE4A) der apikalen VSNs und gegen die Familie C der basalen V2R-VSNs (V2R2-Antikörper) demaskierten einen selektiven Verlust von basalen vomeronasalen Neuronen auf ungefähr die Hälfte in  $G\alpha_o$ -defizienten Mäusen verglichen mit der Wildtypmauslinie B6. Die Anzahl der apikalen VSNs hingegen war nicht verändert (Chamero et al., 2011). Ein Verlust von  $G\alpha_o$  verursacht also einen selektiven Verlust von basalen V2R-VSNs.

Ähnliche Beobachtungen sind von Norlin et al. (2003) bei der globalen  $G\alpha_{i2}$ -Deletion, von Tanaka et al. (1999) bei der globalen  $G\alpha_o$ -Deletion und von Stowers et al. (2002) bei TRPC2-Deletion im VNO gemacht worden (Norlin et al., 2003; Stowers et al., 2002; Tanaka et al.,

1999). Dieser Verlust könnte sekundär entstehen, wenn die vomeronasalen Sinneszellen in ihrer Funktion beeinträchtigt werden oder ihre Funktion vollkommen einbüßen. Festzuhalten ist, dass eine ausreichende V2R-Population in  $cG\alpha_o^{-/-}$  vorhanden war, sodass Experimente zur funktionellen Analyse  $G\alpha_o$  in V2R-VSNs durchgeführt werden konnten.

### 5.1.3 Elektrovomeronasogramme in $cG\alpha_o^{-/-}$

Um die Funktion von  $G\alpha_o$  in der Signaltransduktion zu untersuchen und um festzustellen, ob der Verlust von  $G\alpha_o$  die elektrische Aktivierbarkeit von vomeronasalen Sinneszellen verändert, wurden Elektrovomeronasogramme (EVGs) erstellt. EVGs sind Potentialänderungen, die durch lokale Stimulusapplikation induziert und von der Oberfläche der vomeronasalen Sinneszellen abgeleitet werden.

In der  $cG\alpha_o^{-/-}$ -Mauslinie konnten nahezu keine Feldpotentiale mehr mit den V2R-Liganden SYFPEITHI, MUP25 und ESP1 ausgelöst werden. Im Gegensatz dazu evozierten die V2R-Liganden in der Kontrollmauslinie  $G\alpha_o^{fx/fx}$  und Wildtypmauslinie B6 robuste Potentialänderungen, sodass das G-Protein  $G\alpha_o$  essentiell für die Signaltransduktion von V2R-VSNs ist. Die Stimulierung der V1R-VSNs via 2-Heptanon und Isobutylamin zeigte in  $cG\alpha_o^{-/-}$  die gleichen starken Potentialänderungen wie in  $G\alpha_o^{fx/fx}$  und B6, sodass diese apikal lokalisierten VSNs von der  $G\alpha_o$ -Deletion unbeeinflusst bleiben. Dieses war zu erwarten, weil das G-Protein  $G\alpha_o$  nicht in V1R/  $G\alpha_{i2}$ -VSNs exprimiert wird.

### 5.1.4 Kalziumimaging, Verhaltensexperimente und das hauptolfaktorische System von $cG\alpha_o^{-/-}$

#### *Kalziumimaging in $cG\alpha_o^{-/-}$*

Chamero et al. (2011) untersuchten anschließend in dissoziierten Zellen, ob das G-Protein  $G\alpha_o$  für einen Stimulus-induzierten intrazellulären Kalziumkonzentrationsanstieg

(sogenanntes ratiometrisches Kalziumimaging) in den vomeronasalen Sinneszellen benötigt wird. Während die Potentialänderungen in den Elektrovomeronasogrammen die Summe der ausgelösten Rezeptorpotentiale widerspiegeln, so stellt der durch Stimulation ausgelöste intrazelluläre Kalziumkonzentrationsanstieg den Kalzium-Kationeneinstrom dar, welcher der Rezeptoraktivierung nachgeschaltet ist. Die antwortenden vomeronasalen Sinneszellen können mittels posthoc durchgeführter immunohistochemischer Färbungen mit Antikörpern als V1R- beziehungsweise V2R-VSNs demaskiert werden. Die Resultate dieser Experimente stimmten mit den elektrophysiologischen Untersuchungen (Elektrovomeronasogrammen) überein:  $G\alpha_o$ -defiziente VSNs antworteten nicht auf V2R-Liganden.

Chamero et al. (2011) applizierten neben isolierten Liganden auch vollständig intakten Urin und Urin-Fractionen von männlichen B6-Mäusen (Chamero et al., 2011). Mittels Zentrifugation durch eine Membran wurde der B6-Urin in die *low molecular weight* (LMW < 3 kDa) und *high molecular weight* (HMW > 10 kDa) Fraktionen getrennt. Die LMW-Fraktion enthält unter anderem kleine Peptide und VUDs (siehe auch 2.6.2). Die HMW-Fraktion hingegen enthält die fünf MUPs (B6-MUPs), die Mauslinien-spezifisch (hier B6) exprimiert und in den Urin sezerniert werden. Bereits 2007 publizierten Chamero et al., dass sowohl B6-MUPs als auch die LMW-Fraktion des Urins in der Lage sind, männliches Aggressionsverhalten im Resident-Intruder-Assay auszulösen (Chamero et al., 2007) (siehe auch 2.6.3 Major Urinary Proteins und 2.7.2 Aggressionsverhalten).

Die Kalziumimaging-Experimente in  $cG\alpha_o^{-/-}$  zeigten, dass die HMW-Fraktion, also die B6-MUPs, V2R-VSNs aktivierten und dass diese Aktivierung abhängig von der  $G\alpha_o$ -Expression war. Die LMW-Fraktion hingegen wurde auch von *Nicht-V2R-VSNs* detektiert. Dementsprechend war auch nur ein Teil der LMW-aktivierten VSNs abhängig von  $G\alpha_o$ -Expression (Chamero et al., 2011).

### *Verhaltensexperimente in $cG\alpha_o^{-/-}$*

Aufgrund der in den EVGs und Kalziumimaging dargestellten drastischen Reduktion von aktivierbaren VSNs sowohl auf MUP25 als auch auf alle B6-MUPs in der  $cG\alpha_o^{-/-}$ -Mauslinie entstand die Fragestellung, ob der Funktionsverlust im VNO einen Einfluss auf das MUP-induzierte Aggressionsverhalten hat.

Der konditionelle Knockout zeigte im Vergleich zum Wildtyp B6 tatsächlich ein erheblich reduziertes Aggressionsverhalten im Resident-Intruder-Assay bei Verwendung der B6-MUPs. Dieses galt sowohl für männliches als auch maternales aggressives Verhalten. Darüber hinaus war jedoch auch die LMW-Fraktion des Urins nicht in der Lage, physiologisch aggressives Verhalten in  $cG\alpha_o^{-/-}$  zu stimulieren. In diesem Kontext kann die Nicht-Erkennung über V2R/ $G\alpha_o$  also nicht allein ursächlich für die Veränderung im Verhaltensphänotyp sein. Elektrophysiologie und ratiometrisches Kalziumimaging stellten einen Defekt in V2R-VSNs in  $G\alpha_o$ -defizienten Mäusen dar, die V1R-VSNs sind jedoch unbeeinflusst. Dass LMW dennoch nicht in der Lage war, aggressives Verhalten zu stimulieren, spricht dafür, dass das G-Protein  $G\alpha_o$  eine entscheidende Rolle bei der Demonstration von aggressivem Verhalten spielt, unabhängig davon, welcher Stimulus dieses Verhalten auslöst (Chamero et al., 2011).

### *Die Funktion des hauptolfaktorischen Systems von $cG\alpha_o^{-/-}$*

Auch olfaktorische Neurone des hauptolfaktorischen Systems exprimieren die Haupt-G-Protein-Klassen des AOS.  $G\alpha_{i2}$ -Expression ließ sich in einer Neuronen-Subpopulation im MOE darstellen.  $G\alpha_o$  hingegen wurde ubiquitär in Axonen der olfaktorischen Rezeptorneurone des MOE und auch in den Glomeruli des MOB lokalisiert (Wekesa and Anholt, 1999). Störungen im MOS, insbesondere in der Signaltransduktion des MOE, führten ebenfalls zu verändertem Aggressionsverhalten (Mandiyan et al., 2005; Wang, 2006). Da die konditionelle  $G\alpha_o$ -Knockout Maus OMP-abhängig *cre* exprimiert, ist das G-Protein  $G\alpha_o$  in

allen OMP-positiven Neuronen ausgeschaltet. Da auch reife hauptolfaktorische Sinneszellen (OSNs) OMP exprimieren, sind diese OSNs ebenfalls  $G\alpha_o$ -defizient (siehe auch 3.3.1). In diesem Zusammenhang musste ausgeschlossen werden, dass das hauptolfaktorische System (MOS) der  $cG\alpha_o^{-/-}$  Defizite aufweist. Wären Defizite vorhanden, könnte das MOS genauso an dem veränderten Verhaltensphänotyp beteiligt sein wie das AOS. Die Analyse von Geruchsinvestigation, Nahrungslokalisierung und des olfaktorischen Habituation-Dishabituation-Tests in  $cG\alpha_o^{-/-}$  offenbarten keine signifikanten Unterschiede zur B6. Auch das von einem intakten MOS abhängige Wiederauffinden des Nachwuchses im *pup retrieval*-Test war in  $cG\alpha_o^{-/-}$  gegenüber B6 unverändert, und zeigte damit an, dass das VNO-unabhängige maternale Verhalten ebenfalls unverändert war (Chamero et al., 2011; Wysocki and Lepri, 1991). Diese Resultate bestätigen die Intaktheit des MOS und schließen eine MOS-Dysfunktion als Ursache des reduzierten Aggressionsverhaltens aus. Es lässt sich auch schlussfolgern, dass die entdeckte  $G\alpha_o$ -Expression im MOS keine entscheidende Rolle bei diesen getesteten Funktionen inne haben kann (Wekesa and Anholt, 1999). Die Funktion von  $G\alpha_{i2}$ - und  $G\alpha_o$  im MOS ist dennoch weiterhin unbekannt.

### 5.1.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Aggressions-induzierende Liganden werden von unterschiedlichen neuronalen Schaltkreisen des akzessorischen olfaktorischen Systems verarbeitet. Sowohl die volatilen Urinduftstoffe SBT und DHB als auch MUPs sind in der Lage, Aggressionsverhalten zu stimulieren (Chamero et al., 2007; Novotny et al., 1985). Während die VUDs von apikalen V1R-VSNs detektiert werden (Leinders-Zufall et al., 2000), werden MUPs von basalen V2R-VSNs erkannt (Chamero et al., 2007, 2011). Sobald eines der individuellen Systeme beeinträchtigt ist, beispielsweise das apikale System durch V1r-Cluster- (Del Punta et al., 2002) oder  $G\alpha_{i2}$ -Deletion (Norlin et al., 2003) oder das basale System durch beta-2-Mikroglobulin- (Loconto et al., 2003) oder  $G\alpha_o$ -Deletion (Chamero et al., 2011), kommt es zu ausgeprägten Verhaltensveränderungen mit drastisch reduziertem beziehungsweise abwesendem



Aggressionsverhalten. Die Mauslinie von Norlin et al. (2003) für das apikale und von Loconto et al. (2003) für das basale System waren globale  $G\alpha_{i2}$ - respektive beta-2-Mikroglobulin Knockout-Tiere, sodass hier nur eingeschränkt Interpretationen für Informationsintegration möglich waren (Loconto et al., 2003; Norlin et al., 2003). Im Gegensatz dazu sind die Daten von Del Punta et al. (2002) und die hier präsentierten Daten aus Mauslinien mit isolierten Deletionen im olfaktorischen System (Chamero et al., 2011; Del Punta et al., 2002) und lassen deshalb folgende Schlussfolgerung zu:

Trotz individueller Stimulusdetektion und individueller Schaltwege scheinen beide Systeme bei der Stimulation von Aggressionsverhalten eng zusammenzuarbeiten. Ein Defekt entweder des apikalen oder des basalen Systems führte zu drastischen Phänotyp-Veränderungen. Es scheinen somit mehrere Aggressions-stimulierende Schaltkreise zu existieren und die Integration jeder dieser Schaltkreise scheint essentiell für die Generation von Aggressionsverhalten. Nur die Intaktheit aller Schaltkreise gewährleistet einen physiologischen Phänotyp in Mäusen.

Kürzlich veröffentlichten Oboti et al. (2014) die phänotypischen Charakteristika der weiblichen, konditionellen  $G\alpha_o$ -Knockout Maus. Sie zeigten, dass zahlreiche Pheromon-stimulierte Sexual- und Reproduktionsverhalten wie der Vandenbergh-Effekt, der Whitten-Effekt, das Lordosierungsverhalten und assoziatives Erkennen volatiler Duftstoffe in dieser Mauslinie gestört sind (Oboti et al., 2014). Die drastisch reduzierte Aktivierbarkeit von V2R-VSNs durch ESP1 respektive MUP25-Stimulation in den Elektrovomeronasogrammen ließ phänotypische Defekte beim Lordosierungsverhalten und Einschränkungen beim assoziativen Duftstoff-Erkennen als sehr naheliegend voraussagen, denn ESP1 stimuliert über V2Rp5 das Lordosierungsverhalten (Haga et al., 2010) und ein MUP („Darcin“, siehe auch 2.6.3) ist am assoziativen Erkennen von volatilen Duftstoffen beteiligt (Roberts et al., 2012). Für die Östrus-Induktion/Synchronisation und Pubertätsbeschleunigung hingegen sind Stimulatoren bekannt, die über die apikale V1R-Sinnesschicht vermittelt werden (SBT und DHB) (Jemiolo et al., 1986; Mucignat-Caretta et al., 1995; Novotny and Wiesler, 1999). Die Tatsache, dass sich auch Östrus-Induktion und Pubertätsbeschleunigung in der

konditionellen  $G\alpha_o$ -Knockoutmauslinie defekt zeigen, unterstützt das Modell einer parallelen Prozessierung beziehungsweise Integration von Informationen über mehrere Schaltkreise, die ein intaktes apikales und basales System voraussetzen, um physiologische Verhalten zu generieren. Um nun festzustellen, ob das Modell der parallelen Prozessierung beziehungsweise Integration auch auf das Lordosierungsverhalten und das assoziative Duftstoff-Erkennen zutrifft, ist die Untersuchung einer konditionellen  $G\alpha_{i2}$ -Knockoutmauslinie von besonderer Bedeutung. Sollten sich in dieser „apikalen“ Knockoutmauslinie Pheromon-Effekte defekt zeigen, die vom basalen System prozessiert werden (zum Beispiel Lordosierungsverhalten, assoziatives Duftstoff-Erkennen), kann das hier dargestellte Modell verallgemeinert beziehungsweise bestätigt werden.

## 5.2 Die Funktion von H2Mv in vomeronasalen V2R-Sinneszellen

### 5.2.1 Die H2Mv-Knockoutmauslinie erlaubt die Untersuchung der *in vivo*

#### Funktion von H2Mv

Im Jahr 2003 entdeckten Ishii et al. (2003) und Loconto et al. (2003) die H2Mv-Expression in den basal-gelegenen V2R-Sinneszellen. Die *in vivo* Funktion der nicht klassischen MHC-Moleküle in den Sinneszellen ist seither jedoch unbekannt. Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten mit heterologen Zellen und Überexpression ließ die Autoren zweier Studien vermuten, dass H2-M10-Proteine als Escort-Molekül an der Oberflächenexpression der V2-Rezeptoren beteiligt sind (Dey and Matsunami, 2011; Ishii et al., 2003; Loconto et al., 2003). MHC-Moleküle sind im zentralen Nervensystem an der Ausbildung und Reifung synaptischer Verschaltungen beteiligt (siehe auch 2.3.7). Ishii et al. (2008) identifizierten M10.2, eines der neun exprimierten H2Mv Gene, in axonalen Enden von V2R-Sinneszellen, sodass auch hier eine Funktion bei der Ausreifung von Synapsen zwischen vomeronasalen Sinneszellen und Mitralzellen im akzessorischen olfaktorischen Bulbus denkbar war, bisher aber nicht untersucht werden konnte, da eine H2Mv-defiziente Mauslinie zur Untersuchung dieser Hypothese nicht existierte (Ishii and Mombaerts, 2008).

Sowohl die Ergebnisse von Loconto et al. (2003) und Olson et al. (2005) (siehe 2.3.7 Mögliche Funktionen von H2Mv) schließen eine Funktion von H2Mv im Immunsystem zwar nicht vollkommen aus, sind aber mit den aktuellen Erkenntnissen nur wenig vereinbar (Loconto et al., 2003; Olson et al., 2005). Die Präsentation endogener Peptide durch H2Mv ist daher eher unwahrscheinlich. Indes steht eine Rolle bei der Rezeption exogener Peptide in der Diskussion. H2Mv könnte entweder als direkter Rezeptor oder als Korezeptor respektive Modulator in einem Multirezeptorkomplex fungieren. Unterstützt wird diese Hypothese durch zwei Aspekte: Zum einen beginnt die H2Mv-Expression erst postnatal und lässt deshalb eher eine Funktion für reife vomeronasale V2R-Sinneszellen vermuten (Ishii et al., 2003; Loconto et al., 2003). Darüber hinaus offenbarte die konfokale *en face* Mikroskopie

des Vomeronasalorgans der H2-M10.2-GFP-Mauslinie, welche das in 95% der H2Mv-VSNs vorkommende M10.2 als Fusionsprotein mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) exprimieren, dass M10.2 sehr stark in den Mikrovilli der vomeronasalen Sinneszellen angereichert ist (Leinders-Zufall et al., 2014). Dieses bestätigte die Annahme von Loconto et al. (2003), die in Western Blot Experimenten Multi-Rezeptorkomplexe von M10.7 mit V2R und beta-2-Mikroglobulin darstellten (Loconto et al., 2003). Im Jahr 2004 veröffentlichten Leinders-Zufall et al., dass vomeronasale V2R-Sinneszellen in der Lage sind, MHC-Peptide zu detektieren (Leinders-Zufall, 2004). Dass H2Mv nicht als Rezeptor für die MHC-Peptide fungiert, konnte ebenfalls von Leinders-Zufall et al. (2009) gezeigt werden: Das MHC-Peptid SYFPEITHI beispielsweise kann von H2Mv-negativen V2R1b-Sinneszellen in picomolaren Konzentrationen erkannt werden, sodass H2Mv hier nicht als alleiniger Rezeptor fungieren kann (Leinders-Zufall et al., 2009).

ESP1 aus der Tränendrüse von männlichen Mäusen aktiviert V2Rp5-VSNs und kann darüber Lordose-Verhalten in Weibchen stimulieren (Haga et al., 2010). Dass V2Rp5 variabel mit M10.1 - M10.6 exprimiert wird und ESP1 dennoch reproduktiv hochsensitiv von diesen VSNs erkannt wird, spricht ebenfalls gegen eine direkte Rezeptor-Funktion von H2Mv in der Detektion des V2R-Liganden ESP1 (Haga et al., 2007).

Während Hypothesen wie Antigenpräsentation oder Entwicklungsfunktion vorerst entkräftet werden konnten, konnten Hypothesen wie Chaperon-Funktion oder Rezeptormodulation hingegen durch *in vitro* Experimente respektive Erkenntnisse anderer Multirezeptorinteraktionen partiell untermauert werden. Dennoch konnte die tatsächliche Rolle von H2Mv bisher nicht entschlüsselt werden. Ursächlich dafür war das Fehlen einer Mauslinie mit einer Deletion des H2Mv-Genclusters, welche viele der entstandenen Fragestellungen beantworten könnte.

Peter Mombaerts kreierte mittels Chromosomen Engineering die  $\Delta$ H2Mv-Mauslinie. Diese besaß eine Gencluster-Deletion des 530 Kilobasen großen MHC-Locus *H2Mv*. Durch

Rückkreuzung der Tiere wurde die korrespondierende Kontrollmauslinie 129/Sv produziert. In Kollaboration mit den Arbeitsgruppen von Frau Professor Leinders-Zufall, Professor Ishii (Tokio, Department of Cell Biology and Center for Brain Integration Research), Professor Zufall (Homburg, Institut für Physiologie Universität des Saarlandes), Dr. Pablo Chamero (Homburg, Institut für Physiologie) und Professor Mombaerts (Frankfurt, Max Planck Institut für Neurogenetik) konnte die *in vivo* Funktion von H2Mv im Vomeronasalorgan der Maus untersucht werden, um schließlich einige Rätsel um H2Mv aufzuklären.

### 5.2.2 Die Anatomie des AOS der $\Delta$ H2Mv

In-situ-Hybridisierung (ISH) mit H2Mv Sonden bestätigten die Abwesenheit der H2Mv Expression in der  $\Delta$ H2Mv. Die mit einer pan-MHC Sonde durchgeführte ISH offenbarte, dass auch keine anderen MHC-Transkripte im VNO exprimiert werden, sodass die Deletion von H2Mv keine kompensatorische Heraufregulation anderer MHC-Gene herbeiführte. Die Expression von  $G\alpha_o$  zeigte sich gegenüber der  $G\alpha_{i2}$ -Expression in der  $\Delta$ H2Mv leicht reduziert mit einem  $G\alpha_o/G\alpha_{i2}$ -Verhältnis von 0,93 in der Knockoutmauslinie gegenüber 0,99 in der Kontrollmauslinie 129/Sv, sodass die Deletion von H2Mv zu einem marginalen  $G\alpha_o$ -Sinneszell-Verlust führte. Drei-Farben ISH mit Sonden für jede der drei Sinneszellschichten illustrierte die Aufrechterhaltung der anatomischen Dreischichtung des vomeronasalen Sinnesepithels, wie sie bereits von Ishii et al. (2008) veröffentlicht wurde (Ishii and Mombaerts, 2008; Leinders-Zufall et al., 2014). Neben dem VNO zeigte auch der akzessorische olfaktorische Bulbus (AOB) keine drastischen anatomischen Unterschiede in der  $\Delta$ H2Mv. Die axonalen Projektionen der VSNs zum AOB waren nicht auffällig verändert, sodass eine übergeordnete Rolle für H2Mv in der axonalen Ausrichtung und synaptischen Plastizität – wie beispielsweise für die Axone der retinalen Ganglienzellen (siehe auch 2.3.7 Mögliche Funktionen von H2Mv) – für VSNs daher weitestgehend ausgeschlossen werden konnte. Daher konnten diese Tiere auch benutzt werden, um die physiologische Rolle von H2Mv zu untersuchen (Leinders-Zufall et al., 2014).

### 5.2.3 Elektrovomeronasogramme in $\Delta H2Mv$

Um eine mögliche Funktion von H2Mv in der Signaltransduktion vomeronasaler Sinneszellen zu untersuchen, wurde das VNO von  $\Delta H2Mv$  und 129/Sv mit V1R- und V2R-Liganden stimuliert. Die Maximalamplituden von drei der vier applizierten V2R-Liganden waren in der  $\Delta H2Mv$  gegenüber der 129/Sv stark reduziert, nur der V2R-Ligand SYFPEITHI löste bei der hohen, gesättigten Konzentration von  $10^{-11}$  M gleich große robuste Potentialänderungen aus. Im Gegensatz zu den V2R-Liganden evozierten die V1R-Liganden gleich große Maximalamplituden in  $\Delta H2Mv$  und 129/Sv.

Da die Antworten auf ESP1, rMUP25 und SEIDLILGY in  $\Delta H2Mv$  sich zwar erheblich reduziert aber dennoch auslösbar zeigten, kann eine essentielle Funktion von H2Mv für die Detektion dieser V2R-Liganden auf Grundlage der Elektrovomeronasogramme ausgeschlossen werden. Dass H2Mv nicht als Rezeptor für MHC-Peptid-Detektion fungiert, wurde auch durch Leinders-Zufall et al. (2009) bestätigt (Leinders-Zufall et al., 2009). Dass H2Mv auch nicht als Rezeptor für ESP1 fungiert, wurde von Haga et al. (2007) aufgrund der variablen H2-M10-Protein-Expression in V2Rp5-VSNs vermutet und konnte durch die EVGs in  $\Delta H2Mv$  nun bestätigt werden (Haga et al., 2007). Neben MHC-Peptiden und ESP stellen MUPs die dritte prototypische Peptid/Protein Familie dar, die als V2R-Liganden fungiert. Für MUPs kann in Analogie angenommen werden, dass H2Mv nicht essentiell für die Chemodetektion in vomeronasalen Sinneszellen ist.

Die Oberflächenexpression von H2Mv, die Assoziation von H2Mv zum V2R-Rezeptorkomplex und die zwar auslösbaren, aber schwachen Potentialänderungen waren Grundlage für die Hypothese, dass H2Mv eine Rolle bei der Sensitivitäts-Modulation von V2R-Sinneszellen spielen könnte. Um dieses zu untersuchen, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven für die drei V2R-Liganden ESP1, rMUP25 und SEIDLILGY in  $\Delta H2Mv$  und 129/Sv erstellt. Es zeigte sich eine parallele Rechtsverschiebung der  $\Delta H2Mv$ -Dosis-Wirkungs-Kurven für alle drei Liganden. Während die Maximalamplituden sich in Knockout und Wildtyp glichen, waren die Schwellenkonzentration und  $EC_{50}$ -Konzentration in  $\Delta H2Mv$  um das 8- bis

16-fache erhöht. Demzufolge ist H2Mv nicht essentiell für die Erzeugung physiologischer Antworten, sondern für die ultrasensitive Chemodetektion bestimmter basaler VSNs.

#### 5.2.4 Kalziumimaging in $\Delta$ H2Mv

Eine kleine Subpopulation von basalen V2R-VSNs exprimiert den V2Rf2-Rezeptor. Diese Zellen koexprimieren neben V2Rf2 das G-Protein  $G\alpha_o$  und H2Mv ( $V2Rf2^+/G\alpha_o^+/H2Mv^+$ ) (Ishii and Mombaerts, 2008). Das MHC-Peptid SEIDLILGY und das formylierte Peptid f-MFFINTLTL wurden durch Leinders-Zufall et al. (2014) als V2Rf2 Agonisten identifiziert. Deletion von V2Rf2 in diesen Zellen führte dazu, dass keines der Peptide diese VSNs mehr aktivieren konnte, sodass der V2Rf2 essentiell für die Detektion der Liganden ist. Durch Kreuzung der V2Rf2-markierten Mauslinie mit der  $\Delta$ H2Mv-Mauslinie waren V2Rf2-markierte VSNs zugänglich, die kein H2Mv mehr exprimieren. Auch diese Zellen waren durch SEIDLILGY und f-MFFINTLTL aktivierbar, sodass – übereinstimmend mit den Elektrovomeronasogrammen – eine essentielle Rolle von H2Mv für die Chemodetektion ausgeschlossen werden konnte. Eine detaillierte Analyse der Dosis-Wirkungs-Kurven zeigte, dass wie bei den Elektrovomeronasogrammen insgesamt höhere Konzentrationen erforderlich waren, um die VSNs zu aktivieren. Es zeigte sich eine parallele Rechtsverschiebung der Bindungskurven in  $\Delta$ H2Mv Mäusen gegenüber 129/Sv. Eine 25-fache respektive 34-fache Erhöhung der Konzentration war nötig, um Antworten für f-MFFINTLTL und SEIDLILGY zu erhalten. Damit konnte die Schlussfolgerung aus der Elektrophysiologie (EVGs) in Einzel-Zell-Kalziumimaging-Experimenten bestätigt werden (Leinders-Zufall et al., 2014).

Da die Deletion des 530 Kilobasen H2Mv-Genclusters eine vergleichsweise große genetische Veränderung darstellt, hätten neomorphe Mutationen beispielsweise in nicht H2Mv-exprimierenden VSNs auftreten können. Daher wurden H2Mv-negative V2R1b-VSNs als Kontrolle untersucht:

Der V2R1b-Rezeptor wird von einer Subpopulation von basalen VSNs exprimiert. Diese

liegen apikal in der basalen Nervenzellschicht, sind H2Mv negativ und erkennen das MHC-Peptid SYFPEITHI ( $V2R1b^+/G\alpha_o^+/H2Mv^-$ ) (Ishii and Mombaerts, 2008; Leinders-Zufall et al., 2009). Durch Verpaarung der V2R1b-tauGFP-Mauslinie mit der  $\Delta H2Mv$  konnten erweiterte Kontrollexperimente durchgeführt werden. Eine Deletion der H2Mv Gene sollte keinen Einfluss auf die Bindung von SYFPEITHI an den physiologisch H2Mv-negativen V2R1b haben. Dieses wurde durch sich gleichende Kalziumimaging-Dosis-Wirkungs-Kurven in den jeweiligen Knockout- und korrespondierenden Kontrollmauslinien bestätigt (Leinders-Zufall et al., 2014). Die Elektrovomeronasogramme, die für das MHC-Peptid SYFPEITHI in  $\Delta H2Mv$  ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zur 129/Sv abbildeten, bekräftigten diese Resultate und unterstützen die Aussage, dass die H2Mv Funktion Zell-autonom ist: H2Mv bewirkt in H2Mv-positiven V2R-VSNs die ultrasensitive Chemodetektion ohne Einfluss auf andere Neuronen-Subpopulationen.

Leinders-Zufall et al. (2014) untersuchten auch die Aktivierbarkeit von dissoziierten VSNs auf verschiedene Konzentrationsstufen der HMW-Fraktion des B6-Urins. Es zeigte sich, dass die HMW-Fraktion bei den Verdünnungsstufen 1/1000 und 1/300 in  $\Delta H2Mv$  signifikant weniger VSNs aktivieren konnte als in 129/Sv. Im Gegensatz dazu waren bei der Verdünnungsstufe 1/100 keine signifikanten Zellzahlunterschiede mehr vorhanden (Leinders-Zufall et al., 2014).

### 5.2.5 Der zelluläre Phänotyp der $\Delta H2Mv$

Die Ergebnisse aus den Elektrovomeronasogrammen, Einzelzell-Kalziumimaging und dissoziierten Kalziumimaging-Experimenten ergänzten sich und stellten einen übereinstimmenden zellulären *in vivo* Phänotyp H2Mv-defizienter VSNs dar: Die Maximalamplituden der Antworten auf einen chemischen Stimulus blieben gleich, während sich die Schwellenkonzentration zur Aktivierung und die  $EC_{50}$  Konzentrationen um das 8- bis 34-fache erhöhten. Daraus folgt, dass die vomeronasalen Sinneszellen durch die H2Mv-Deletion eine reduzierte Sensitivität aufweisen. Durch Erhöhung der Stimuluskonzentration jedoch sind die vomeronasalen Sinneszellen genauso aktivierbar, wie es native VSNs sind.



Leinders-Zufall et al. (2012) untersuchten auch die *in vivo* c-Fos Aktivierung im AOB nach oronasaler ESP1-Exposition (Leinders-Zufall et al., 2014). C-Fos wird bei intakter Chemodetektion unmittelbar nach der Stimulation von VSNs in den Mitral- und den Körnerzellen des AOB exprimiert und ist in diesem Kontext als Aktivitätsparameter des akzessorischen olfaktorischen Systems etabliert (Brennan et al., 1992). Während in 129/Sv bereits 1  $\mu$ M ausgeprägte c-Fos-Immunoreaktivität in Neuronen des AOB induzierte, reichte diese Konzentration in  $\Delta$ H2Mv nicht für die Induktion einer detektierbaren c-Fos Expression aus. Die Erhöhung der Konzentration auf 100  $\mu$ M ESP1 hingegen produzierte eine signifikant robustere c-Fos-Immunoreaktivität, sodass der zelluläre Phänotyp des VNO sich zumindest teilweise auch auf den AOB ausbreitete (Leinders-Zufall et al., 2014).

Es entstand die Fragestellung, ob dieser kennzeichnende zelluläre Phänotyp des akzessorischen olfaktorischen Systems einen Einfluss auf den Verhaltensphänotyp hat beziehungsweise mit einem veränderten VNO-abhängigen Verhaltensphänotyp assoziiert ist.

### 5.2.6 Verhaltensexperimente in $\Delta$ H2Mv

Im Resident-Intruder-Assay (siehe auch 2.7.2 Aggressionsverhalten) zeigten  $\Delta$ H2Mv Männchen auf Urin, die LMW- und die HMW-Fraktion des Urins signifikant reduziertes Aggressionsverhalten. Aufgrund des zellulären Phänotyps mit einer reduzierten Sensitivität, aber gleichen maximalen Antworten bei Konzentrationserhöhung, sowohl für isolierte Liganden als auch für natürliche Stimuli wie die HMW-Fraktion, wurde der RIA erneut mit vier-fach erhöhter HMW Konzentration durchgeführt. Dadurch konnte das Stimulationsdefizit der  $\Delta$ H2Mv im RIA in gleicher Weise wie in den zellulären Messungen überwunden werden, und die Männchen zeigten nahezu das gleiche Aggressionsniveau wie es die Kontrollmauslinie 129/Sv präsentierte. Das Aggressionsverhalten laktierender Weibchen war in  $\Delta$ H2Mv ebenfalls drastisch reduziert. Die Funktion des MOS wurde im *pup retrieval Test* (siehe auch 2.7.2 Aggressionsverhalten) in der Knockout- und Wildtypmauslinie untersucht und zeigte keine Defizite, sodass das MOS intakt schien.

Das ESP1-Peptid aus der Tränendrüse von Männchen ist in der Lage über V2Rp5 in Weibchen Lordoseverhalten anzuregen. Die reduzierte Sensitivität der  $\Delta$ H2Mv VSNs auf ESP1 Stimulation in den Elektrovomeronasogrammen ließ vermuten, dass dieses das Verhalten beeinträchtigt, da eine physiologische zelluläre Detektion durch H2Mv-Deletion nicht mehr gewährleistet ist.  $\Delta$ H2Mv Weibchen zeigten in der Tat ein signifikant reduziertes Lordoseverhalten bei Paarungsversuchen durch Männchen und bestätigten damit die Hypothese, die auf Grundlage des zellulären Phänotyps aufgestellt worden ist.

Zusammenfassend zeigte sich in  $\Delta$ H2Mv ein Verhaltensphänotyp mit stark reduziertem VNO-abhängigem Aggressions- und Sexualverhalten, wobei eine Erhöhung der HMW-Konzentration das männliche Aggressionsdefizit überwinden konnte (Leinders-Zufall et al., 2014).

### 5.2.7 Vergleich von $G\alpha_o$ - und H2Mv-Knockoutmauslinie

Im  $G\alpha_o$ -Knockout zeigte sich ein funktioneller Defekt der basalen Sinneszellschicht und damit einhergehend beeinträchtigte Pheromon-stimulierte Verhalten. Zusammen mit Ergebnissen aus der Literatur entstand ein Modell, bei dem verschiedene Schaltkreise an der Induktion bestimmter Verhalten involviert sind, und bei dem die Integration aller Schaltkreise essentiell für das physiologische Verhalten ist. In der H2Mv-Knockout zeigt sich ebenfalls das basale System defizitär und der Verhaltensphänotyp stellte sich ebenfalls vermindert aggressiv dar. Im Gegensatz zur  $G\alpha_o$ -Knockout konnte dieses Defizit in der H2Mv-Knockout jedoch durch Konzentrationserhöhung überwunden werden. Dass die neuronalen Schaltkreise und die Integration zumindest partiell intakt sind, konnte auf drei Ebenen von der Peripherie nach zentral gezeigt werden:

- (i) Erhöhung der Stimuluskonzentration konnte das Aktivierungsdefizit in VSNs überwinden und gleichgroße Maximalantworten auslösen wie in nativen VSNs;
- (ii) Erhöhung der Stimuluskonzentration konnte das c-Fos-Reaktivitätsdefizit partiell überwinden und

(iii) Erhöhung der Stimuluskonzentration konnte das Aggressionsdefizit überwinden.

### 5.2.8 Schlussfolgerungen aus den Experimenten in $\Delta H2Mv$

Die Funktion von H2Mv ist Zell-autonom. Nur H2Mv-exprimierende VSNs verlieren durch Deletion dieser Gene ihre Ultrasensitivität für Agonisten. Dass das Aggressionsdefizit der  $\Delta H2Mv$  Männchen durch Erhöhung der HMW-Konzentration um den Faktor vier bereits überwunden werden konnte, zeigt an, dass vomeronasale Sinneszellen hochsensitive Detektoren für Pheromone darstellen, und dass H2Mv in nativen VSNs die Ultrasensitivität der Chemodetektion gewährleistet (Leinders-Zufall et al., 2014). Die Stimuluskonzentration scheint daher bei der Auslösung VNO-abhängiger Verhaltensweisen durch natürliche Stimuli von außerordentlicher Wichtigkeit zu sein. Dieses ist vereinbar mit den natürlicherweise nur sehr geringen Konzentrationen dieser Stimuli in der Umwelt, beispielsweise im Urin (Sturm et al., 2013).

### 5.2.9 Ausblick

Durch Elektrophysiologie und Kalziumimaging in  $\Delta H2Mv$  konnte erstmals die *in vivo* Funktion von H2Mv in vomeronasalen Sinneszellen untersucht werden. Beide Methoden bilden dabei jedoch Parameter ab, die der Rezeptor-Liganden-Interaktion nachgeschaltet sind. Es wird also die Sensitivität der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade bestimmt. Ob die Sensitivität auf Grund einer veränderten H2Mv-V2R-Interaktion zustande kommt, oder durch eine reduzierte V2R-Expression an der Zelloberfläche begründet wird, kann derzeit noch nicht abschließend beantwortet werden. Die Beantwortung dieser Frage stellt eine große Herausforderung dar. Sowohl für die Rezeptor-Korezeptor-Interaktion als auch für die Darstellung einer möglichen reduzierten Zelloberflächen-Rezeptorexpression *in vivo* ist noch keine adäquaten experimentellen Herangehensweisen etabliert.

*Wie könnte eine mögliche Rezeptor-Korezeptor-Liganden-Interaktion untersucht werden und welche Grundlage stützt die Annahme einer möglichen Modulation des V2-Rezeptors?*

Der HFE-Transferrin-Rezeptor-Komplex reguliert über Transferrin-Bindung die Eisenhomöostase des Organismus. Das HFE (HLA-H) Protein ähnelt atypischen MHC-Molekülen, ist wie MHC ebenfalls mit beta-2-Mikroglobulin (b2m) assoziiert, und HFE-Mutationen und b2m-Knockout führen zur Eisenüberladung des Organismus (Andrews and Levy, 1998; Lebron et al., 1998; Rothenberg and Volland, 1996). In dem Rezeptorkomplex bindet der Transferrin-Rezeptor (TfR) das Transferrin, und das HFE-Protein dient der Modulation der Rezeptorsensitivität (Feder et al., 1998). Bennett et al. (2000) untersuchten mittels Kristallographie die Struktur des isolierten TfR und die Struktur des HFE-TfR-Komplexes und fanden verschiedene Konformationen, sodass diese Konformationsänderung durch HFE die Sensitivität des Rezeptor-Komplexes begründen kann (Bennett et al., 2000). In Analogie könnte H2Mv als Modulator des V2-Rezeptors fungieren, indem es die Konformation des Heterodimers so verändert, dass die Affinität der V2Rs erhöht wird. Kristallographie-Experimente könnten also Aufschluss geben, ob die nicht klassischen MHC-Moleküle eine Modulationsfunktion im Rezeptorkomplex inne haben. Kürzlich identifizierten Wu et al. (2014) das Kristallmodell des metabotropen Glutamaterezeptors 1 (mGlu1), welcher einen allosterischen Modulator bindet. Wie mGlu1 stellt V2R ebenfalls einen Sieben-Transmembran und G-Protein-gekoppelten Rezeptor der Klasse C dar, sodass hier elementare Vorarbeiten in der Kristallographie bereits beschrieben sind (Wu et al., 2014).

Da b2m ein wichtiges Molekül im HFE-TfR-Rezeptorkomplex zu sein scheint – da auch b2m-Knockout Tiere ein Rezeptordefizit aufweisen – wäre es interessant, ob b2m-Knockout Tiere den gleichen zellulären und Verhaltens- Phänotyp aufweisen wie die H2Mv-defiziente Mauslinie. Ein stark vermindertes Aggressionsverhalten der b2m-Knockoutmauslinie ist von Loconto et al. (2003) bereits gezeigt worden (Loconto et al., 2003). Eine ausführliche

anatomische und zelluläre Phänotypcharakterisierung steht jedoch noch aus.

Neben der Hypothese der Modulation des V2-Rezeptorkomplexes stellten zwei Studien aus heterologen Zellen mit Überexpression die Hypothese auf, dass H2Mv als Chaperone fungieren und an der Oberflächenexpression beteiligt sind (Dey and Matsunami, 2011; Loconto et al., 2003). Die Beantwortung der Frage nach einer möglichen reduzierten Rezeptorexpression an der Zelloberfläche von  $\Delta$ H2Mv benötigt einen Antikörper für definierte Rezeptoren. So könnte man theoretisch Antikörper-markierte Rezeptoren in Knockoutmäusen und Wildtypmäusen auf der Zelloberfläche auszählen und anschließend vergleichen. Dafür müsste jedoch ein adäquater Antikörper zur Verfügung stehen, welcher isoliert den Rezeptor an seiner Zelloberfläche markiert. Kommerziell erwerblich ist so ein Antikörper bisher nicht und die Eigenentwicklung beansprucht häufig mehrere Monate bis Jahre.

Die Aufklärung, über welche Mechanismen letztendlich die reduzierte Sensitivität der vomeronasalen Sinneszellen durch H2Mv-Deletion zustande kommt, bleibt also abzuwarten. Mit der Entschlüsselung der *in vivo* Funktion von H2Mv konnte jedoch entscheidend dazu beigetragen werden, die Rolle von nicht klassischen MHC-Molekülen in der Olfaktorik zu identifizieren.

## 5.3 Formyl-Peptid-Rezeptoren und die Erkennung formylierter Peptide im Vomeronasalorgan der Maus

### 5.3.1 Eine immunologische Funktion des Vomeronasalorgans?

Die Entdeckung der Expression von Formyl-Peptid-Rezeptoren im Vomeronasalorgan verkörpert neben der MHC-Molekül-Expression und MHC-Peptid-Erkennung ein weiteres Auftreten von Molekülen im Geruchssystem, welche klassischerweise aus dem Bereich der Immunologie stammen.

In ihrer charakteristischen Funktion dienen MHC-Moleküle und ihre *Antigene*, die MHC-Peptide, dem Immunsystem. Der T-Zell-Rezeptor von  $CD_8^+$ -Lymphozyten differenziert kernhaltige Zellen anhand ihrer vom MHC-Molekül präsentierten MHC-Peptidfragmente in körpereigenen und fremd. In ähnlicher Analogie fungieren MHC-Peptide bei der chemischen Kommunikation. Mäuse sind in der Lage, MHC-Peptide aus dem Urin über das olfaktorische System zu detektieren. In diesem Kontext wurde gezeigt, dass das Wahrnehmen der MHC-Peptide der Unterscheidung von Individualität dient. Mäuse erkennen so Nachkommen, Artgenossen und mögliche Paarungs-Partner (siehe auch 2.7.4 Erkennen von Individualität).

Die Elektrovomeronasogramme konnten zusammen mit weiteren Experimenten um Leinders-Zufall et al. (2014) erstmals zeigen, dass die MHC-Moleküle *in vivo* der Modulation von Sensitivität bestimmter vomeronasaler Sinneszellen dienen (Leinders-Zufall et al., 2014). Ob und inwiefern die MHC-Molekül-Expression (*H2Mv*) und die MHC-Peptid-Erkennung eine immunologische Funktion im oder über das Vomeronasalorgan vermitteln, ist noch unbekannt.

Formyl-Peptid-Rezeptoren (FPRs) besitzen eine übergeordnete Rolle im Immunsystem im Bereich der Inflammation und Bekämpfung pathogener Zustände. Die Aktivierung der FPRs induziert in Phagozyten Chemotaxis, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und die Freisetzung proteolytischer Enzyme. Die Entdeckung der Expression von Formyl-Peptid-

Rezeptoren im Vomeronasalorgan im Jahr 2009 lies weitere Hypothesen einer Verbindung von Immunologie und Olfaktorik aufkommen (Liberles et al., 2009; Rivière et al., 2009). Interessant war insbesondere, ob diese Rezeptoren auch im VNO ihr charakteristisches Ligandenspektrum detektieren können, und ob in diesem Zusammenhang der Geruchssinn an der Erkennung von entzündlichen oder anderen pathogenen Zuständen von Artgenossen involviert sein könnte. Tatsächlich konnten Riviere et al. (2009) Agonisten humaner FPRs als Agonisten der mFpr-rs-VSNs identifizieren. Dazu gehören neben dem prototypischen FPR-Agonisten f-MLF auch CRAMP, uPAR und Lipoxin A4 (Rivière et al., 2009). Die *in vivo* Funktion der Erkennung dieser Moleküle durch das Vomeronasalorgan ist jedoch weiterhin unbekannt.

### **5.3.2 Verschiedene vomeronasale Sinneszellen erkennen prototypische humane FPR-Agonisten**

Prototypische Agonisten der FPRs im Immunsystem sind formylierte Peptide und das synthetische Hexapeptid W-Peptid. Die Ableitung charakteristischer EVGs mit den fünf hFPR-aktivierenden Peptiden f-MLF, f-MFINRWLFS, f-MFFINTLTL, f-MFFINILTL und W-Peptid zeigte, dass vomeronasale Sinneszellen diese prototypischen Liganden des Immunsystems detektieren können. Applikation dieser Liganden in genetisch veränderten Mauslinien mit isolierter  $G\alpha_o$ - respektive H2Mv-Deletion zeigte, dass diese fünf Peptide von unterschiedlichen Neuronenpopulationen transduziert werden.

Die von der mitochondrialen NADH-Dehydrogenase I (NDI) kodierte Peptid-Derivate f-MFFINTLTL (NDI-6T) und f-MFFINILTL (NDI-6I) unterscheiden sich nur in der Aminosäure-Sequenz an Stelle 6. Beide Peptide waren nicht in der Lage,  $G\alpha_o$ -defiziente VSNs zu aktivieren. Damit kommen sowohl mFpr-rs1-VSNs als auch V2R-VSNs als transduzierende Rezeptorpopulation infrage, da beide Sinneszellpopulationen physiologisch  $G\alpha_o$  exprimieren. In der  $\Delta$ H2Mv waren ebenfalls drastisch reduzierte Antworten auf NDI-6T und NDI-6I auffällig. Durch Applikation steigender Konzentrationen von NDI-6T glichen sich die

Antworten in  $\Delta H2Mv$  jedoch bis an die physiologische Ausprägung nativer VSNs an, sodass bei der Detektion von f-MFFINTLTL die H2Mv-Expression eine entscheidende Rolle für die ultrasensitive Erkennung spielt. Dieses wurde zuvor für die V2R-Liganden ESP1, rMUP25 und SEIDLILGY gezeigt (siehe 4.4.3). V2Rs-VSNs erkennen charakteristischerweise verschiedene Protein- und Peptidmoleküle (Chamero et al., 2012). In Zusammenschau mit der Literatur konnte daher vermutet werden, dass dieses n-formylierte Nonamer (NDI-6T), und mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch das NDI-6I-Derivat, weitere Liganden der V2R-Familie darstellen. Leinders-Zufall et al. (2014) bestätigten diese Annahme durch Einzelzell-Kalzium-Imaging-Experimente in markierten V2Rf2/ $G\alpha_o$ /H2Mv<sup>+</sup>-VSNs (Leinders-Zufall et al., 2014). Da nicht auszuschließen ist, dass auch andere Subpopulationen im VNO f-MFFINTLTL und/oder f-MFFINILTTL erkennen können: (beispielsweise die ebenfalls  $G\alpha_o$ -exprimierenden mFpr-rs1-VSNs), sind weitere Experimente erforderlich. Mittels posthoc Immunhistochemie- oder Doppel-In-Situ-Hybridisierung-Experimente mit einem Antikörper/einer Sonde gegen mFpr-rs1, beispielsweise, könnte diese Fragestellung beantwortet werden. Stünde beispielsweise eine Mauslinie mit einer Markierung der mFpr-rs-1-VSNs zur Verfügung, könnten diese Rezeptor-Liganden idealerweise auch in Einzelzelluntersuchung untersucht werden.

Die Experimente mit den drei hFPR-aktivierenden Peptiden f-MLF, f-MFFINRWLFS und W-Peptid zeigten, dass diese  $G\alpha_o$ - und H2Mv-unabhängig transduziert werden. Mehrere Sinneszellpopulationen kommen dementsprechend als transduzierende Neurone infrage. Die FPRs im Immunsystem sind vor allem  $G\alpha_i$  gekoppelt, wobei auch andere G-Protein-Koppelungen im Immunsystem gezeigt werden konnten (Migeotte et al., 2006). Auch im VNO liegt auf Grund der  $G\alpha_o$ -unabhängigen Transduktion (siehe 4.3.3) die Vermutung nahe, dass diese drei Peptide von  $G\alpha_{i2}$  exprimierenden mFpr-rs3, -rs4, -rs6 respektive -rs7 VSNs erkannt werden könnten. Die Untersuchung einer Mauslinie mit einem konditionellen  $G\alpha_{i2}$ -Knockout ( $cG\alpha_{i2}^{-/-}$ ) könnte diese Fragestellung genauer beantworten. Sollten keine Antworten mehr auslösbar sein, so sind neben den genannten mFpr-rs-VSNs nur noch V1R-VSNs bekannte potentielle Rezeptorneurone. Das typische Ligandenspektrum der



V1Rs sind jedoch volatile Duftstoffe, und eine Peptiddetektion konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Chamero et al., 2012), sodass dieses sehr untypisch wäre. Zur endgültigen Beantwortung der Frage, ob und welche mFpr-rs-Rezeptorneurone diese Peptide transduzieren, müssten Einzelzellmessungen mit genetisch markierten mFpr-rs-VSNs, Kalziumimaging mit posthoc Immunhistochemie oder Doppel-In-Situ-Hybridisierungs-Experimente durchgeführt werden.

Sollten in einer  $cG\alpha_{i2}^{-/-}$  immer noch Antworten mit hFPR-Liganden auslösbar sein, könnten andere G-Proteine wie  $G\alpha_{q/11}$  oder  $G\alpha_s$  an der Transduktion beteiligt sein (Berghard and Buck, 1996; Wekesa, 2003). Ob dieses der Fall ist, könnte beispielsweise durch einen konditionellen  $G\alpha_{i2}/G\alpha_o$ -Doppelknockout gezeigt werden, der trotz Verlust der quantitativ am häufigsten exprimierten G-Proteine  $G\alpha_{i2}$  und  $G\alpha_o$  immer noch eine elektrische Aktivierbarkeit aufweisen würde. Ein limitierender Faktor bei dieser Herangehensweise ist jedoch möglicherweise ein ausgeprägter Sinneszellverlust, da sowohl in der globalen Deletion von  $G\alpha_{i2}$  und TRPC2 als auch bei der gewebsspezifischen Deletion von  $G\alpha_o$  die vomeronasale Sinneszellzahl quantitativ bis zu 50% reduziert ist (Chamero et al., 2011; Norlin et al., 2003; Stowers et al., 2002; Tanaka et al., 1999). Initial müssten also anatomische Untersuchungen des Doppel-Knockouts Aufschluss über die Ausprägung eines möglichen Sinneszellverlusts geben.

Nicht vollkommen auszuschließen ist, dass diese drei hFPR-aktivierenden Peptide ebenfalls von V2R-Subpopulationen detektiert werden können, die nicht  $G\alpha_o$ , sondern ein anderes G-Protein exprimieren, da der  $G\alpha_o$ -Knockout Antworten auf diese Peptide zeigte.

Die H2Mv-unabhängige Transduktion der drei Peptide f-MLF, f-MFFINRWLFS und W-Peptid wurde für definierte Konzentrationen gezeigt. Es besteht daher auch die Möglichkeit, dass eine kleine V2R-VSN-Subpopulation –  $G\alpha_o$ -unabhängig – auf Grund von Stimulation mit gesättigten Konzentrationen auf diese drei Peptide mit kräftigen Potentialänderungen antwortet.

### 5.3.3 Die Erkennung Krankheits-assoziiierter Zustände über das Vomeronasalorgan?

Es steht fest, dass Liganden der humanen FPRs in der Lage sind, vomeronasale Sinneszellen elektrisch zu aktivieren, und dass diese fünf applizierten hFPR-aktivierenden Peptide unterschiedliche Sensitivitäten für unterschiedliche vomeronasale Sinneszellpopulationen besitzen. Die Funktion der Erkennung von diesen Krankheits-assoziierten Molekülen durch das Vomeronasalorgan ist bisher unbekannt. Riviere et al. (2009) zeigten, dass Aktivatoren humaner FPRs auch bestimmte mFpr-rs-exprimierende vomeronasale Sinneszellen aktivieren können und vermuteten daher, dass diese speziellen olfaktorischen Neurone der Identifizierung von Pathogenen oder Krankheits-assoziierten Zuständen dienen könnten (Rivière et al., 2009). Eine Studie zeigte bereits, dass Mäuse in der Lage sind, Urin von gesunden und von Influenza-infizierten Artgenossen zu unterscheiden. Der Duft von infizierten Männchen löste kein aversives, vermeidendes Verhalten aus. Vielmehr verlor der Urin seine Attraktivität für Weibchen im Vergleich zu nicht infiziertem Urin (Penn et al., 1998). Insgesamt bevorzugten Weibchen nicht infizierte, immunkompetente Partner (Beltran-Bech and Richard, 2014). Formyl-Peptid-Rezeptoren könnten bei der Erkennung und Zuordnung bestimmter pathogener Zustände involviert sein. Der in 4.3.2 dargestellte Nachweis, dass weitere prototypische FPR-Liganden das VNO aktivieren können, verstärkt die Vermutung einer Rolle der vomeronasalen FPRs, die der klassischen FPR-Funktion aus dem Immunsystem nahekommt. Um dieses zu überprüfen, wären weitere Experimente mit den hFPR-aktivierenden Peptiden sinnvoll. Die durchgeführten Elektrovomeronasogramme erweitern das bisher bekannte Ligandenspektrum im VNO um prototypische formylierte Peptide. Die transduzierenden Sinneszellpopulationen konnten eingegrenzt werden. Weitere Experimente müssen nun im Detail aufzeigen, welche Sinnespopulationen die Peptide detektieren. Verhaltensexperimente können aufzeigen, ob diese Peptide Vermeidungsverhalten induzieren, oder ob Paarungs- oder Sexualverhalten beeinflusst werden. Sollte dieses der Fall sein, würde eine Verbindung von Stimulus und Verhalten etabliert werden können.

Weitere Versuche könnten daraufhin abbilden, welche höheren Zentren an der Informationsverarbeitung und Integration beteiligt sind und könnten so bisher unerforschte Funktionen von Formyl-Peptid-Rezeptoren oder Formyl-Peptid-Erkennung im zentralen Nervensystem entschlüsseln.

Vorerst bleibt die Frage nach der *in vivo* Funktion der FPRs und der Formyl-Peptid-Erkennung im VNO jedoch unbeantwortet und stellt damit ein weiteres Rätsel in der Pheromonkommunikation dar.



## 6 Literaturverzeichnis

- Adams, E.J., and Luoma, A.M. (2013). The adaptable major histocompatibility complex (MHC) fold: structure and function of nonclassical and MHC class I-like molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 529–561.
- Adrian, E.D. (1950). The electrical activity of the mammalian olfactory bulb. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 2, 377–388.
- Adrian, E.D. (1955). Potential oscillations in the olfactory organ. *J Physiol Lond* 128, 21–22.
- Altner, H., and Müller, W. (1968). Elektrophysiologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Riechschleimhaut des Jacobsonschen Organs von Eidechsen (*Lacerta*). *Z. Für Vgl. Physiol.* 60, 151–155.
- Andrews, N.C., and Levy, J.E. (1998). Iron is hot: an update on the pathophysiology of hemochromatosis. *Blood* 92, 1845–1851.
- Apfelbach, R., Blanchard, C.D., Blanchard, R.J., Hayes, R.A., and McGregor, I.S. (2005). The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1123–1144.
- Bakalyar, H.A., and Reed, R.R. (1990). Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* 250, 1403–1406.
- Bean, N.J., and Wysocki, C.J. (1989). Vomeronasal organ removal and female mouse aggression: the role of experience. *Physiol. Behav.* 45, 875–882.
- Belluscio, L., Gold, G.H., Nemes, A., and Axel, R. (1998). Mice Deficient in G $\alpha_{olf}$  Are Anosmic. *Neuron* 20, 69–81.
- Beltran-Bech, S., and Richard, F.-J. (2014). Impact of infection on mate choice. *Anim. Behav.* 90, 159–170.
- Bennett, M.J., Lebrón, J.A., and Bjorkman, P.J. (2000). Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature* 403, 46–53.
- Berghard, A., and Buck, L.B. (1996). Sensory transduction in vomeronasal neurons: evidence for G $\alpha_o$ , G $\alpha_{i2}$ , and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 909–918.
- Beynon, R.J., and Hurst, J.L. (2003). Multiple roles of major urinary proteins in the house mouse, *Mus domesticus*. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 142–146.
- Bibb, M.J., Van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W., and Clayton, D.A. (1981). Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26, 167–180.
- Billig, G.M., Pál, B., Fidzinski, P., and Jentsch, T.J. (2011). Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>−</sup> currents are dispensable for olfaction. *Nat. Neurosci.* 14, 763–769.
- Bjorkman, P.J., and Parham, P. (1990). Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 253–288.

- Böcskei, Z., Groom, C.R., Flower, D.R., Wright, C.E., Phillips, S.E., Cavaggioni, A., Findlay, J.B., and North, A.C. (1992). Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature* 360, 186–188.
- Boehm, U., Zou, Z., and Buck, L.B. (2005). Feedback Loops Link Odor and Pheromone Signaling with Reproduction. *Cell* 123, 683–695.
- Boschat, C., Pélofi, C., Randin, O., Roppolo, D., Lüscher, C., Broillet, M.-C., and Rodriguez, I. (2002). Pheromone detection mediated by a V1r vomeronasal receptor. *Nat. Neurosci.* 5, 1261–1262.
- Bossert, W.H., and Wilson, E.O. (1963). The analysis of olfactory communication among animals. *J. Theor. Biol.* 5, 443–469.
- Brechbühl, J., Klaey, M., and Broillet, M.-C. (2008). Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science* 321, 1092–1095.
- Breer, H., Fleischer, J., and Strotmann, J. (2006). The sense of smell: multiple olfactory subsystems. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 1465–1475.
- Brennan, P.A., and Zufall, F. (2006). Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 444, 308–315.
- Brennan, P., Kaba, H., and Keverne, E.B. (1990). Olfactory recognition: a simple memory system. *Science* 250, 1223–1226.
- Brennan, P.A., Hancock, D., and Keverne, E.B. (1992). The expression of the immediate-early genes c-fos, egr-1 and c-jun in the accessory olfactory bulb during the formation of an olfactory memory in mice. *Neuroscience* 49, 277–284.
- Bruce, H.M. (1959). An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature* 184, 105.
- Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175–187.
- Bufe, B., Schumann, T., and Zufall, F. (2012). Formyl Peptide Receptors from Immune and Vomeronasal System Exhibit Distinct Agonist Properties. *J. Biol. Chem.* 287, 33644–33655.
- Bushdid, C., Magnasco, M.O., Vosshall, L.B., and Keller, A. (2014). Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science* 343, 1370–1372.
- Byers, D.E., and Lindahl, K.F. (1999). Peptide affinity and concentration affect the sensitivity of M3-restricted CTLs induced in vitro. *J. Immunol.* 163, 3022–3028.
- Caligioni, C.S. (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* Editor. Board Jacqueline N Crawley A1 *Appendix 4*, Appendix 4I.
- Chamero, P., Marton, T.F., Logan, D.W., Flanagan, K., Cruz, J.R., Saghatelian, A., Cravatt, B.F., and Stowers, L. (2007). Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* 450, 899–902.
- Chamero, P., Katsoulidou, V., Hendrix, P., Bufe, B., Roberts, R., Matsunami, H., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., Zufall, F., and Leinders-Zufall, T. (2011). G protein G(alpha)o is essential for vomeronasal function and aggressive behavior in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 12898–12903.

- Chamero, P., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2012). From genes to social communication: molecular sensing by the vomeronasal organ. *Trends Neurosci.* 35, 597–606.
- Cheetham, S.A., Thom, M.D., Jury, F., Ollier, W.E.R., Beynon, R.J., and Hurst, J.L. (2007). The Genetic Basis of Individual-Recognition Signals in the Mouse. *Curr. Biol.* 17, 1771–1777.
- Chiu, N.M., Chun, T., Fay, M., Mandal, M., and Wang, C.-R. (1999). The majority of H2-M3 is retained intracellularly in a peptide-receptive state and traffics to the cell surface in the presence of N-formylated peptides. *J. Exp. Med.* 190, 423–434.
- Christophe, T. (2001). The Synthetic Peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH<sub>2</sub> Specifically Activates Neutrophils through FPRL1/Lipoxin A4 Receptors and Is an Agonist for the Orphan Monocyte-expressed Chemoattractant Receptor FPRL2. *J. Biol. Chem.* 276, 21585–21593.
- Chun, T., Serbina, N.V., Nolt, D., Wang, B., Chiu, N.M., Flynn, J.L., and Wang, C.R. (2001). Induction of M3-restricted cytotoxic T lymphocyte responses by N-formylated peptides derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 193, 1213–1220.
- Corriveau, R.A., Huh, G.S., and Shatz, C.J. (1998). Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron* 21, 505–520.
- Dabhi, V.M., Hovik, R., Van Kaer, L., and Lindahl, K.F. (1998). The alloreactive T cell response against the class Ib molecule H2-M3 is specific for high affinity peptides. *J. Immunol.* 161, 5171–5178.
- Davis, M.M., Krogsgaard, M., Huse, M., Huppa, J., Lillemeier, B.F., and Li, Q. (2007). T cells as a self-referential, sensory organ. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 681–695.
- Dey, S., and Matsunami, H. (2011). Calreticulin chaperones regulate functional expression of vomeronasal type 2 pheromone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 16651–16656.
- Drickamer, L.C., McIntosh, T.K., and Rose, E.A. (1978). Effects of ovariectomy on the presence of a maturation-delaying pheromone in the urine of female mice. *Horm. Behav.* 11, 131–137.
- Dulac, C., and Wagner, S. (2006). Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. *Annu. Rev. Genet.* 40, 449–467.
- Feder, J.N., Penny, D.M., Irrinki, A., Lee, V.K., Lebrón, J.A., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, P.J., and Schatzman, R.C. (1998). The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1472–1477.
- Ferrero, D.M., Moeller, L.M., Osakada, T., Horio, N., Li, Q., Roy, D.S., Cichy, A., Spehr, M., Touhara, K., and Liberles, S.D. (2013). A juvenile mouse pheromone inhibits sexual behaviour through the vomeronasal system. *Nature* 502, 368–371.
- Finlayson, J.S., Asofsky, R., Potter, M., and Runner, C.C. (1965). Major urinary protein complex of normal mice: origin. *Science* 149, 981–982.
- Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413, 211–218.
- Gandelman, R. (1972). Mice: Postpartum aggression elicited by the presence of an intruder. *Horm. Behav.* 3, 23–28.
- Gao, J.L., Chen, H., Filie, J.D., Kozak, C.A., and Murphy, P.M. (1998). Differential expansion of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human and mouse. *Genomics* 51, 270–276.

- Getchell, T.V. (1986). Functional properties of vertebrate olfactory receptor neurons. *Physiol. Rev.* 66, 772–818.
- Grosmaître, X., Santarelli, L.C., Tan, J., Luo, M., and Ma, M. (2007). Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nat. Neurosci.* 10, 348–354.
- Grüneberg, H. (1973). A ganglion probably belonging to the N. terminalis system in the nasal mucosa of the mouse. *Z. Für Anat. Entwicklungsgeschichte* 140, 39–52.
- Gutiérrez-García, A.G., Contreras, C.M., Mendoza-López, M.R., Cruz-Sánchez, S., García-Barradas, O., Rodríguez-Landa, J.F., and Bernal-Morales, B. (2006). A single session of emotional stress produces anxiety in Wistar rats. *Behav. Brain Res.* 167, 30–35.
- Gutiérrez-García, A.G., Contreras, C.M., Mendoza-López, M.R., García-Barradas, O., and Cruz-Sánchez, J.S. (2007). Urine from stressed rats increases immobility in receptor rats forced to swim: Role of 2-heptanone. *Physiol. Behav.* 91, 166–172.
- Haga, Kimoto, and Touhara (2007). Molecular characterization of vomeronasal sensory neurons responding to a male-specific peptide in tear fluid: Sexual communication in mice. *Pure Appl. Chem.* 79, 775–783.
- Haga, S., Hattori, T., Sato, T., Sato, K., Matsuda, S., Kobayakawa, R., Sakano, H., Yoshihara, Y., Kikusui, T., and Touhara, K. (2010). The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. *Nature* 466, 118–122.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 391, 85–100.
- Hasen, N.S., and Gammie, S.C. (2009). Trpc2 gene impacts on maternal aggression, accessory olfactory bulb anatomy and brain activity. *Genes Brain Behav.* 8, 639–649.
- Hebb, A.L.O., Zacharko, R.M., Dominguez, H., Trudel, F., Laforest, S., and Drolet, G. (2002). Odor-induced variation in anxiety-like behavior in mice is associated with discrete and differential effects on mesocorticolimbic cholecystokinin mRNA expression. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 27, 744–755.
- Hosoya, Y., and Yoshida, H. (1937). Über die bioelektrischen Erscheinungen an der Riechschleimhaut. *J Med Sci III Biophys.* 5, 22.
- Hsu, F.-F., Nodari, F., Kao, L.-F., Fu, X., Holekamp, T.F., Turk, J., and Holy, T.E. (2008). Structural Characterization of Sulfated Steroids That Activate Mouse Pheromone-Sensing Neurons<sup>†</sup>. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 14009–14019.
- Huh, G.S., Boulanger, L.M., Du, H., Riquelme, P.A., Brotz, T.M., and Shatz, C.J. (2000). Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290, 2155–2159.
- Hurst, J.L., Payne, C.E., Nevison, C.M., Marie, A.D., Humphries, R.E., Robertson, D.H., Cavaggioni, A., and Beynon, R.J. (2001). Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature* 414, 631–634.
- Inamura, K., Kashiwayanagi, M., and Kurihara, K. (1997). Blockage of urinary responses by inhibitors for IP<sub>3</sub>-mediated pathway in rat vomeronasal sensory neurons. *Neurosci. Lett.* 233, 129–132.



- Ishii, T., and Mombaerts, P. (2008). Expression of nonclassical class I major histocompatibility genes defines a tripartite organization of the mouse vomeronasal system. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 2332–2341.
- Ishii, T., and Mombaerts, P. (2011). Coordinated coexpression of two vomeronasal receptor V2R genes per neuron in the mouse. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 397–408.
- Ishii, T., Hirota, J., and Mombaerts, P. (2003). Combinatorial coexpression of neural and immune multigene families in mouse vomeronasal sensory neurons. *Curr. Biol.* 13, 394–400.
- Isogai, Y., Si, S., Pont-Lezica, L., Tan, T., Kapoor, V., Murthy, V.N., and Dulac, C. (2011). Molecular organization of vomeronasal chemoreception. *Nature* 478, 241–245.
- Jacobson, L., Trotier, D., and Døving, K.B. (1998). Anatomical description of a new organ in the nose of domesticated animals by Ludvig Jacobson (1813). *Chem. Senses* 23, 743–754.
- Jemiolo, B., and Novotny, M. (1994). Inhibition of sexual maturation in juvenile female and male mice by a chemosignal of female origin. *Physiol. Behav.* 55, 519–522.
- Jemiolo, B., Alberts, J., Sochinski-Wiggins, S., Harvey, S., and Novotny, M. (1985). Behavioural and endocrine responses of female mice to synthetic analogues of volatile compounds in male urine. *Anim. Behav.* 33, 1114–1118.
- Jemiolo, B., Harvey, S., and Novotny, M. (1986a). Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 4576–4579.
- Jemiolo, B., Harvey, S., and Novotny, M. (1986b). Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4576–4579.
- Jemiolo, B., Harvey, S., and Novotny, M. (1986c). Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 4576–4579.
- Jemiolo, B., Andreolini, F., Xie, T.M., Wiesler, D., and Novotny, M. (1989). Puberty-affecting synthetic analogs of urinary chemosignals in the house mouse, *Mus domesticus*. *Physiol. Behav.* 46, 293–298.
- Jemiolo, B., Xie, T.-M., Andreolini, F., Baker, A.E.M., and Novotny, M. (1991). The complex of the mouse: Chemical characterization by urinary volatile profiles. *J. Chem. Ecol.* 17, 353–367.
- Jia, C., and Halpern, M. (1996). Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins ( $G_{i2}$  and  $G_{o\alpha}$ ) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain Res.* 719, 117–128.
- Jiang, M., Gold, M.S., Boulay, G., Spicher, K., Peyton, M., Brabet, P., Srinivasan, Y., Rudolph, U., Ellison, G., and Birnbaumer, L. (1998). Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein  $G_o$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3269–3274.
- Jiang, M., Spicher, K., Boulay, G., Martín-Requero, A., Dye, C.A., Rudolph, U., and Birnbaumer, L. (2002). Mouse gene knockout and knockin strategies in application to alpha subunits of Gi/Go family of G proteins. *Methods Enzymol.* 344, 277–298.
- Jones, D.T., and Reed, R.R. (1989). Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244, 790–795.

- Karlson, P., and Luscher, M. (1959). Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183, 55–56.
- Kelliher, K.R., Spehr, M., Li, X.-H., Zufall, F., and Leinders-Zufall, T. (2006a). Pheromonal recognition memory induced by TRPC2-independent vomeronasal sensing. *Eur. J. Neurosci.* 23, 3385–3390.
- Kelliher, K.R., Spehr, M., Li, X.-H., Zufall, F., and Leinders-Zufall, T. (2006b). Pheromonal recognition memory induced by TRPC2-independent vomeronasal sensing. *Eur. J. Neurosci.* 23, 3385–3390.
- Kenakin, T.P. (1986). Receptor reserve as a tissue misnomer. *Trends Pharmacol. Sci.* 7, 93–95.
- Keverne, E.B. (1983). Pheromonal influences on the endocrine regulation of reproduction. *Trends Neurosci.* 6, 381–384.
- Keverne, E.B. (1999). The vomeronasal organ. *Science* 286, 716–720.
- Kim, S., Ma, L., and Yu, C.R. (2011). Requirement of calcium-activated chloride channels in the activation of mouse vomeronasal neurons. *Nat. Commun.* 2, 365.
- Kim, S., Ma, L., Jensen, K.L., Kim, M.M., Bond, C.T., Adelman, J.P., and Yu, C.R. (2012). Paradoxical contribution of SK3 and GIRK channels to the activation of mouse vomeronasal organ. *Nat. Neurosci.* 15, 1236–1244.
- Kimoto, H., Haga, S., Sato, K., and Touhara, K. (2005). Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* 437, 898–901.
- Kimoto, H., Sato, K., Nodari, F., Haga, S., Holy, T.E., and Touhara, K. (2007). Sex- and Strain-Specific Expression and Vomeronasal Activity of Mouse ESP Family Peptides. *Curr. Biol.* 17, 1879–1884.
- Kleene, S.J. (2008). The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. *Chem. Senses* 33, 839–859.
- Kostenis, E., Waelbroeck, M., and Milligan, G. (2005). Techniques: promiscuous Galpha proteins in basic research and drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 595–602.
- Kurlander, R.J., Shawar, S.M., Brown, M.L., and Rich, R.R. (1992). Specialized role for a murine class I-b MHC molecule in prokaryotic host defenses. *Science* 257, 678–679.
- Kwon, H.J., Koo, J.H., Zufall, F., Leinders-Zufall, T., and Margolis, F.L. (2009). Ca extrusion by NCX is compromised in olfactory sensory neurons of OMP mice. *PloS One* 4, e4260.
- Ladewig, J., and Hart, B.L. (1980). Flehmen and vomeronasal organ function in male goats. *Physiol. Behav.* 24, 1067–1071.
- Lambert, D. (2004). Drugs and receptors. *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain* 4, 181–184.
- Law, J.H., and Regnier, F.E. (1971). Pheromones. *Annu. Rev. Biochem.* 40, 533–548.
- Le, Y., Murphy, P.M., and Wang, J.M. (2002). Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol.* 23, 541–548.

- Lebron, J.A., Bennett, M.J., Vaughn, D.E., Chirino, A.J., Snow, P.M., Mintier, G.A., Feder, J.N., and Bjorkman, P.J. (1998). Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 93, 111–123.
- Leinders-Zufall, T. (2004). MHC Class I Peptides as Chemosensory Signals in the Vomeronasal Organ. *Science* 306, 1033–1037.
- Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2013). The electrovomeronasogram: field potential recordings in the mouse vomeronasal organ. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1068, 221–236.
- Leinders-Zufall, T., Lane, A.P., Puche, A.C., Ma, W., Novotny, M.V., Shipley, M.T., and Zufall, F. (2000). Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature* 405, 792–796.
- Leinders-Zufall, T., Cockerham, R.E., Michalakis, S., Biel, M., Garbers, D.L., Reed, R.R., Zufall, F., and Munger, S.D. (2007). Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 14507–14512.
- Leinders-Zufall, T., Ishii, T., Mombaerts, P., Zufall, F., and Boehm, T. (2009). Structural requirements for the activation of vomeronasal sensory neurons by MHC peptides. *Nat. Neurosci.* 12, 1551–1558.
- Leinders-Zufall, T., Ishii, T., Chamero, P., Hendrix, P., Oboti, L., Schmid, A., Kircher, S., Pyrski, M., Akiyoshi, S., Khan, M., et al. (2014). A family of nonclassical class I MHC genes contributes to ultrasensitive chemodetection by mouse vomeronasal sensory neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 5121–5133.
- Leypold, B.G., Yu, C.R., Leinders-Zufall, T., Kim, M.M., Zufall, F., and Axel, R. (2002). Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 6376–6381.
- Liberles, S.D. (2014). Mammalian Pheromones. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 151–175.
- Liberles, S.D., and Buck, L.B. (2006). A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature* 442, 645–650.
- Liberles, S.D., Horowitz, L.F., Kuang, D., Contos, J.J., Wilson, K.L., Siltberg-Liberles, J., Liberles, D.A., and Buck, L.B. (2009). Formyl peptide receptors are candidate chemosensory receptors in the vomeronasal organ. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 9842–9847.
- Liman, E.R., and Corey, D.P. (1996). Electrophysiological characterization of chemosensory neurons from the mouse vomeronasal organ. *J. Neurosci.* 16, 4625–4637.
- Liman, E.R., Corey, D.P., and Dulac, C. (1999). TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 5791–5796.
- Lindahl, K.F., Byers, D.E., Dabhi, V.M., Hovik, R., Jones, E.P., Smith, G.P., Wang, C.R., Xiao, H., and Yoshino, M. (1997). H2-M3, a full-service class Ib histocompatibility antigen. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 851–879.
- Liu, J., Shen, Y., Li, M., Shi, Q., Zhang, A., Miao, F., Liu, J., Wu, X., He, Y., and Zhang, J. (2013). The expression pattern of classical MHC class I molecules in the development of mouse central nervous system. *Neurochem. Res.* 38, 290–299.

- Loconto, J., Papes, F., Chang, E., Stowers, L., Jones, E.P., Takada, T., Kumánovics, A., Lindahl, K.F., and Dulac, C. (2003). Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules. *Cell* 112, 607–618.
- Logan, D.W., Marton, T.F., and Stowers, L. (2008). Species specificity in major urinary proteins by parallel evolution. *PLoS One* 3, e3280.
- Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2003). A Diacylglycerol-Gated Cation Channel in Vomeronasal Neuron Dendrites Is Impaired in *TRPC2* Mutant Mice: Mechanism of Pheromone Transduction. *Neuron* 40, 551–561.
- Luo, M. (2003). Encoding Pheromonal Signals in the Accessory Olfactory Bulb of Behaving Mice. *Science* 299, 1196–1201.
- Luo, Y., Lu, S., Chen, P., Wang, D., and Halpern, M. (1994). Identification of chemoattractant receptors and G-proteins in the vomeronasal system of garter snakes. *J. Biol. Chem.* 269, 16867–16877.
- Ma, M., Grosmaître, X., Iwema, C.L., Baker, H., Greer, C.A., and Shepherd, G.M. (2003). Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. *J. Neurosci.* 23, 317–324.
- Mandiyani, V.S., Coats, J.K., and Shah, N.M. (2005). Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice. *Nat. Neurosci.* 8, 1660–1662.
- Marquardt, D. (1963). An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11, 431–441.
- Matsuda, H., Kusakabe, T., Kawakami, T., Takenaka, T., Sawada, H., and Tsukuda, M. (1996). Coexistence of nitric oxide synthase and neuropeptides in the mouse vomeronasal organ demonstrated by a combination of double immunofluorescence labeling and a multiple dye filter. *Brain Res.* 712, 35–39.
- Menco, B.P., Cunningham, A.M., Qasba, P., Levy, N., and Reed, R.R. (1997). Putative odour receptors localize in cilia of olfactory receptor cells in rat and mouse: a freeze-substitution ultrastructural study. *J. Neurocytol.* 26, 691–706.
- Meredith, M. (1994). Chronic recording of vomeronasal pump activation in awake behaving hamsters. *Physiol. Behav.* 56, 345–354.
- Migeotte, I., Communi, D., and Parmentier, M. (2006). Formyl peptide receptors: A promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 501–519.
- Mir, S.A., and Sharma, S. (2013). Role of MHC class Ib molecule, H2-M3 in host immunity against tuberculosis. *Vaccine* 31, 3818–3825.
- Mohedano-Moriano, A., Pro-Sistiaga, P., Ubeda-Bañón, I., Crespo, C., Insausti, R., and Martínez-Marcos, A. (2007). Segregated pathways to the vomeronasal amygdala: differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2065–2080.
- Mombaerts, P. (1996). Targeting olfaction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 481–486.
- Mombaerts, P. (2004a). Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 263–278.

- Mombaerts, P. (2004b). Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor–one neuron hypothesis revisited. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 31–36.
- Morse, M.-C., Bleau, G., Dabhi, V.M., Hetu, F., Drobetsky, E.A., Lindahl, K.F., and Perreault, C. (1996). The COI mitochondrial gene encodes a minor histocompatibility antigen presented by H2-M3. *J. Immunol.* 156, 3301–3307.
- Mucignat-Caretta, C., Caretta, A., and Cavaggioni, A. (1995). Acceleration of puberty onset in female mice by male urinary proteins. *J. Physiol.* 486, 517–522.
- Müller, W. (1971). Vergleichende elektrophysiologische Untersuchungen an den Sinnesepithelien des Jacobsonschen Organs und der Nase von Amphibien (*Rana*), Reptilien (*Lacerta*) und Säugetieren (*Mus*). *Z. Für Vgl. Physiol.* 72, 370–385.
- Müller-Schwarze, D. (1991). The chemical ecology of ungulates. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 29, 389–402.
- Munger, S.D., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2009). Subsystem Organization of the Mammalian Sense of Smell. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 115–140.
- Nishimura, K., Utsumi, K., Yuhara, M., Fujitani, Y., and Iritani, A. (1989). Identification of puberty-accelerating pheromones in male mouse urine. *J. Exp. Zool.* 251, 300–305.
- Nodari, F., Hsu, F.-F., Fu, X., Holekamp, T.F., Kao, L.-F., Turk, J., and Holy, T.E. (2008). Sulfated Steroids as Natural Ligands of Mouse Pheromone-Sensing Neurons. *J. Neurosci.* 28, 6407–6418.
- Norlin, E.M., Gussing, F., and Berghard, A. (2003). Vomeronasal phenotype and behavioral alterations in *Gai2* mutant mice. *Curr. Biol.* 13, 1214–1219.
- Novotny, M.V., and Wiesler, D. (1999). Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 266, 2017–2022.
- Novotny, M., Harvey, S., Jemiolo, B., and Alberts, J. (1985). Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 2059–2061.
- Novotny, M., Jemiolo, B., Harvey, S., Wiesler, D., and Marchlewska-Koj, A. (1986). Adrenal-mediated endogenous metabolites inhibit puberty in female mice. *Science* 231, 722–725.
- Olson, R., Huey-Tubman, K.E., Dulac, C., and Bjorkman, P.J. (2005). Structure of a pheromone receptor-associated MHC molecule with an open and empty groove. *PLoS Biol.* 3, e257.
- Orban, P.C., Chui, D., and Marth, J.D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6861–6865.
- Ottoson, D. (1954). Sustained potentials evoked by olfactory stimulation. *Acta Physiol. Scand.* 32, 384–386.
- Ottoson, D. (1955). Analysis of the electrical activity of the olfactory epithelium. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 35, 1–83.
- Pace, U., Hanski, E., Salomon, Y., and Lancet, D. (1985). Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* 316, 255–258.

- Pamer, E.G., Wang, C.R., Flaherty, L., Lindahl, K.F., and Bevan, M.J. (1992). H-2M3 presents a *Listeria monocytogenes* peptide to cytotoxic T lymphocytes. *Cell* 70, 215–223.
- Panaro, M.A., Acquafredda, A., Sisto, M., Lisi, S., Maffione, A.B., and Mitolo, V. (2006). Biological Role of the N-Formyl Peptide Receptors. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 28, 103–127.
- Pankevich, D.E. (2004). Olfactory Sex Discrimination Persists, Whereas the Preference for Urinary Odorants from Estrous Females Disappears in Male Mice after Vomeronasal Organ Removal. *J. Neurosci.* 24, 9451–9457.
- Papes, F., Logan, D.W., and Stowers, L. (2010). The Vomeronasal Organ Mediates Interspecies Defensive Behaviors through Detection of Protein Pheromone Homologs. *Cell* 141, 692–703.
- Penn, D., Schneider, G., White, K., Slev, P., and Potts, W. (1998). Influenza Infection Neutralizes the Attractiveness of Male Odour to Female Mice (*Mus musculus*). *Ethology* 104, 685–694.
- Ploegh, H.L., Orr, H.T., and Strominger, J.L. (1981). Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell* 24, 287–299.
- Del Punta, K., Leinders-Zufall, T., Rodriguez, I., Jukam, D., Wysocki, C.J., Ogawa, S., Zufall, F., and Mombaerts, P. (2002). Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature* 419, 70–74.
- Rabiet, M.-J., Huet, E., and Boulay, F. (2005). Human mitochondria-derived N-formylated peptides are novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while *Listeria monocytogenes*-derived peptides preferentially activate FPR. *Eur. J. Immunol.* 35, 2486–2495.
- Ramírez-Solis, R., Liu, P., and Bradley, A. (1995). Chromosome engineering in mice. *Nature* 378, 720–724.
- Rammensee, H.-G. (1995). Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 85–96.
- Ressler, K.J., Sullivan, S.L., and Buck, L.B. (1993). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73, 597–609.
- Restrepo, D., Arellano, J., Oliva, A.M., Schaefer, M.L., and Lin, W. (2004). Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Horm. Behav.* 46, 247–256.
- Rivière, S., Challet, L., Fluegge, D., Spehr, M., and Rodriguez, I. (2009). Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature* 459, 574–577.
- Roberts, S.A., Simpson, D.M., Armstrong, S.D., Davidson, A.J., Robertson, D.H., McLean, L., Beynon, R.J., and Hurst, J.L. (2010a). Research article Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour.
- Roberts, S.A., Simpson, D.M., Armstrong, S.D., Davidson, A.J., Robertson, D.H., McLean, L., Beynon, R.J., and Hurst, J.L. (2010b). Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC Biol.* 8, 75.

- Roberts, S.A., Davidson, A.J., McLean, L., Beynon, R.J., and Hurst, J.L. (2012). Pheromonal Induction of Spatial Learning in Mice. *Science* 338, 1462–1465.
- Röck, F., Mueller, S., Weimar, U., Rammensee, H.-G., and Overath, P. (2006). Comparative analysis of volatile constituents from mice and their urine. *J. Chem. Ecol.* 32, 1333–1346.
- Rothenberg, B.E., and Volland, J.R. (1996). beta2 knockout mice develop parenchymal iron overload: A putative role for class I genes of the major histocompatibility complex in iron metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1529–1534.
- Schmid, A., Pyrski, M., Biel, M., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2010). Grueneberg ganglion neurons are finely tuned cold sensors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 7563–7568.
- Shatz, C.J. (2009). MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity. *Neuron* 64, 40–45.
- Shawar, S.M., Rich, R.R., and Becker, E.L. (1995). Peptides from the amino-terminus of mouse mitochondrially encoded NADH dehydrogenase subunit 1 are potent chemoattractants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 812–818.
- Shearer, D.A., and Boch, R. (1965). 2-Heptanone in the Mandibular Gland Secretion of the Honey-bee. *Nature* 206, 530–530.
- Sherborne, A.L., Thom, M.D., Paterson, S., Jury, F., Ollier, W.E.R., Stockley, P., Beynon, R.J., and Hurst, J.L. (2007). The Genetic Basis of Inbreeding Avoidance in House Mice. *Curr. Biol.* 17, 2061–2066.
- Shipley, M.T., and Ennis, M. (1996). Functional organization of olfactory system. *J. Neurobiol.* 30, 123–176.
- Singh, P.B., Brown, R.E., and Roser, B. (1987). MHC antigens in urine as olfactory recognition cues. *Nature* 327, 161–164.
- Spehr, M. (2006). Essential Role of the Main Olfactory System in Social Recognition of Major Histocompatibility Complex Peptide Ligands. *J. Neurosci.* 26, 1961–1970.
- Spehr, J., Hagendorf, S., Weiss, J., Spehr, M., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2009). Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin Feedback Mediates Sensory Adaptation and Inhibits Pheromone-Sensitive Ion Channels in the Vomeronasal Organ. *J. Neurosci.* 29, 2125–2135.
- Spehr, M., Hatt, H., and Wetzell, C.H. (2002). Arachidonic acid plays a role in rat vomeronasal signal transduction. *J. Neurosci.* 22, 8429–8437.
- Spehr, M., Spehr, J., Ukhanov, K., Kelliher, K.R., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2006). Parallel processing of social signals by the mammalian main and accessory olfactory systems. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 1476–1484.
- Stephan, A.B., Shum, E.Y., Hirsh, S., Cygnar, K.D., Reiser, J., and Zhao, H. (2009). ANO2 is the ciliary calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11776–11781.
- Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C., Koentges, G. (2002). Loss of Sex Discrimination and Male-Male Aggression in Mice Deficient for TRP2. *Science* 295, 1493–1500.

- Sturm, T., Leinders-Zufall, T., Maček, B., Walzer, M., Jung, S., Pömmerl, B., Stevanović, S., Zufall, F., Overath, P., and Rammensee, H.-G. (2013). Mouse urinary peptides provide a molecular basis for genotype discrimination by nasal sensory neurons. *Nat. Commun.* *4*, 1616.
- Tanaka, M., Treloar, H., Kalb, R.G., Greer, C.A., and Strittmatter, S.M. (1999). G(o) protein-dependent survival of primary accessory olfactory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14106–14111.
- Thompson, R.N. (2006). Attenuation of the Production of Inositol 1,4,5-Trisphosphate in the Mouse Vomeronasal Organ by Antibodies Against the q/11 Subfamily of G-Proteins. *Chem. Senses* *31*, 613–619.
- Thompson, R.N., McMillon, R., Napier, A., and Wekesa, K.S. (2007). Pregnancy block by MHC class I peptides is mediated via the production of inositol 1,4,5-trisphosphate in the mouse vomeronasal organ. *J. Exp. Biol.* *210*, 1406–1412.
- Tirindelli, R., Dibattista, M., Pifferi, S., and Menini, A. (2009). From Pheromones to Behavior. *Physiol. Rev.* *89*, 921–956.
- Vandenbergh, J.G. (1969). Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology* *84*, 658–660.
- Wachowiak, M., and Shipley, M.T. (2006). Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin. Cell Dev. Biol.* *17*, 411–423.
- Wang, Z. (2006). Pheromone Detection in Male Mice Depends on Signaling through the Type 3 Adenylyl Cyclase in the Main Olfactory Epithelium. *J. Neurosci.* *26*, 7375–7379.
- Wang, Z., and Storm, D.R. (2011). Maternal behavior is impaired in female mice lacking type 3 adenylyl cyclase. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *36*, 772–781.
- Wekesa, K.S., Miller, S., Napier A. (2003). Involvement of Gq/11 in signal transduction in the mammalian vomeronasal organ. *J. Exp. Biol.* *206*, 827–832.
- Wekesa, K.S., and Anholt, R.R. (1999). Differential expression of G proteins in the mouse olfactory system. *Brain Res.* *837*, 117–126.
- Whitten, W.K. (1956). Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *J. Endocrinol.* *13*, 399–404.
- Wong, S.T., Trinh, K., Hacker, B., Chan, G.C., Lowe, G., Gaggar, A., Xia, Z., Gold, G.H., and Storm, D.R. (2000). Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* *27*, 487–497.
- Wu, H., Wang, C., Gregory, K.J., Han, G.W., Cho, H.P., Xia, Y., Niswender, C.M., Katritch, V., Meiler, J., Cherezov, V., et al. (2014). Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science* *344*, 58–64.
- Wyatt, T.D. (2003). *Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste* (Cambridge University Press).
- Wysocki, C.J., and Lepri, J.J. (1991). Consequences of removing the vomeronasal organ. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *39*, 661–669.



- Yamazaki, K., Boyse, E.A., Miké, V., Thaler, H.T., Mathieson, B.J., Abbott, J., Boyse, J., Zayas, Z.A., and Thomas, L. (1976). Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* *144*, 1324–1335.
- Yang, C., and Delay, R.J. (2010). Calcium-activated chloride current amplifies the response to urine in mouse vomeronasal sensory neurons. *J. Gen. Physiol.* *135*, 3–13.
- Yoon, H., Enquist, L.W., and Dulac, C. (2005). Olfactory Inputs to Hypothalamic Neurons Controlling Reproduction and Fertility. *Cell* *123*, 669–682.
- Yoshikawa, K., Nakagawa, H., Mori, N., Watanabe, H., and Touhara, K. (2013). An unsaturated aliphatic alcohol as a natural ligand for a mouse odorant receptor. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 160–162.
- Zhang, X., and Firestein, S. (2002). The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat. Neurosci.* *5*, 124–133.
- Zufall, F., and Leinders-Zufall, T. (2007). Mammalian pheromone sensing. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 483–489.

## Publikationen

Chamero, P., Katsoulidou, V., **Hendrix, P.**, Bufe, B., Roberts, R., Matsunami, H., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., Zufall, F., and Leinders-Zufall, T. (2011).

G protein G(alpha)o is essential for vomeronasal function and aggressive behavior in mice.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 12898–12903.

Griessenauer, C.J., Rizk, E., Miller, J.H., **Hendrix, P.**, Tubbs, R.S., Dias, M.S., Riemenschneider, K., and Chern, J.J. (2014).

Pediatric tectal plate gliomas: clinical and radiological progression, MR imaging characteristics, and management of hydrocephalus.

*J. Neurosurg. Pediatr.* 13, 13–20.

**Hendrix, P.**, Griessenauer, C.J., Foreman, P., Loukas, M., Fisher, W.S., 3rd, Rizk, E., Shojja, M.M., and Tubbs, R.S. (2014).

Arterial supply of the lower cranial nerves: a comprehensive review.

*Clin. Anat.* 27, 108–117.

**Hendrix, P.**, Griessenauer, C.J., Cohen-Adad, J., Rajasekaran, S., Cauley, K.A., Shojja, M.M., Pezeshk, P., and Shane Tubbs, R. (2014).

Spinal diffusion tensor imaging: A comprehensive review with emphasis on spinal cord anatomy and clinical applications.

*Clin. Anat. Epub ahead of print, doi: 10.1002/ca.22349*

Leinders-Zufall, T., Ishii, T., Chamero, P., **Hendrix, P.**, Oboti, L., Schmid, A., Kircher, S., Pyrski, M., Akiyoshi, S., Khan, M., Vaes, E., Zufall, F., Mombaerts, P. et al. (2014).

A family of nonclassical class I MHC genes contributes to ultrasensitive chemodetection by mouse vomeronasal sensory neurons.

*J. Neurosci.* 34, 5121–5133.

**Hendrix, P.**, Griessenauer, C.J., Foreman, P., Shojja, M.M., Loukas, M., and Tubbs, R.S. (2014).

Arterial supply of the upper cranial nerves: A comprehensive review.

*Clin. Anat. Epub ahead of print., doi: 10.1002/ca.22415*

## Posterbeitrag

Chamero P, Katsoulidou V, **Hendrix P**, Bufe B, Birnbaumer L, Zufall F, Leinders-Zufall T (2011)  
Involvement of a G-Protein in the detection of chemosensory signals and in the modification of aggressive behavior.

*9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2011*

# Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Trese Leinders-Zufall für die Überlassung einer Doktorarbeit mit vielseitigen Fragestellungen und einer interessanten Methodik. Die stetige Unterstützung bei sowohl inhaltlichen als auch methodischen Fragestellungen und Problemen haben entscheidend zum positiven Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Dankbar bin ich insbesondere auch für die stetige Förderung sowohl im wissenschaftlichen als auch medizinischen Bereich.

Dr. Pablo Chamero danke ich für die viele Zeit, die er sich genommen hat, um meine Fragen zu beantworten und aufkommende Ideen zu diskutieren. Davon profitierte ich sowohl inhaltlich als auch wissenschaftlich enorm.

Eric Jacobi danke ich für seine kontinuierliche Hilfsbereitschaft bei der anfänglichen Einführung in die methodischen Grundlagen der Elektrophysiologie. Er hat sich stets Zeit genommen, war geduldig und konnte hilfreiche Tipps geben.

PD Dr. Andreas Schmid und Dr. Jan Weiss danke ich für die stetige Hilfe bei jeglichen Fragestellungen und für Anregungen beim Verfassen dieser Dissertation.

Christian Schauer danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung hochauflösender Fotografien.

Bei der ganzen AG Leinders-Zufall, AG Zufall und AG Chamero möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und lehrreichen Labortreffen bedanken. Ich danke auch allen Kollaborations-Partnern und Mitarbeitern, die am positiven Gelingen der wissenschaftlichen Arbeiten beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei der StudienStiftungSaar für das Stipendium und die finanzielle Unterstützung, welche mir die Möglichkeit bot, mich auf die Laborarbeit zu fokussieren.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich in den letzten Jahren kontinuierlich unterstützt und motiviert haben.